



Diana Sofia Ferreira Querido

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Análise da infiltração celular numa matriz de nanofibras com poros expandidos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Doutor Jorge Carvalho Silva, Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade NOVA de Lisboa

Júri

Presidente: Prof.^ª Dr.^ª Carla Maria Quintão Pereira
Arguentes: Dr.^ª Andreia Filipa Relvas Pimenta
Vogais: Prof. Dr. Jorge Carvalho Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março, 2019

Análise da infiltração celular numa matriz de nanofibras com poros expandidos

Copyright © Diana Sofia Ferreira Querido, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*"A espantosa realidade das coisas,
É a minha descoberta de todos os dias."*

- Alberto Caeiro

AGRADECIMENTOS

Diversas são as pessoas que cruzam o nosso caminho. Umas dispostas a ensinar, outras para fazer rir até não dar mais e outras ainda para amparar nas dificuldades. Ao longo desta jornada, várias foram as que, de alguma maneira, contribuíram para que esta etapa fosse concluída. Por isso, um primeiro agradecimento à instituição, professores e colegas por me permitirem chegar até aqui. Nesta reta final, quero agradecer em particular:

Ao meu orientador professor Jorge Carvalho Silva, um obrigado é insuficiente para retribuir o quão grata estou por tudo o que me ensinou, pela disponibilidade incansável, paciência e confiança depositada em mim. E ainda por me mostrar sempre uma perspectiva positiva, mesmo diante dos contratempos, fulcral para o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Orlando Teodoro, pela ajuda imprescindível à conceção do sistema de montagem do Ponto de Bolha.

O meu sincero agradecimento, também, aos demais professores, investigadores e engenheiros com quem tive contacto, do departamento de Física e de Ciências dos Materiais, do CENIMAT/I3N e do CEDOC, pelo tempo despendido e auxílio essencial na realização dos ensaios apresentados neste trabalho.

Não posso deixar de agradecer aos meus colegas de laboratório, Daniela Fernandes, Lígia Coelho, Bruno Guerreiro, Jeniffer Farias e Carlos Monteiro, por me terem ajudado e animado os dias, com a maior das alegrias, diversão, união e constante boa disposição.

Agradeço profundamente à minha família, pais e avós, por serem o meu recurso 100% renovável de apoio, força e amor incondicional. E ainda ao meu irmão, o meu maior exemplo. Sem esquecer os meus fiéis amigos de 4 patas, por serem o remédio santo antistress.

Às minhas amigas de infância, de juventude e futuras companheiras de cabelos brancos, Tans, Nês, Pitu, Marts, Clau e Nena. Por serem fonte de risos e abrigo de lágrimas, e por estarem sempre a meu lado, apesar dos muitos momentos de indisponibilidade.

Aos colegas de faculdade que se tornaram grandes amigos. Por todo o espírito de entreajuda e pelas inúmeras aventuras. Em especial, à minha colega de casa, Daniela Rebelo, por ter sido o braço direito e esquerdo durante estes anos. Pelos momentos partilhados, mas sobretudo pela irmandade e companheirismo.

Para além das amizades que aqui nasceram, um obrigada imensurável ao meu melhor amigo, grande confidente e parceiro, José Pelica. Por me dar a conhecer um mundo bem mais descomplicado e por me fazer feliz mesmo nos momentos mais difíceis.

E, por fim, a Deus. É a Ele que devo o maior agradecimento de todos.

RESUMO

A Engenharia de Tecidos tem explorado várias técnicas na produção de estruturas porosas tridimensionais, que permitam mimetizar as condições *in vivo* a que as células estão sujeitas, de modo a promover a regeneração do tecido. A técnica de eletrofiação produz membranas de fibras altamente porosas, mas com poros pequenos, que dificultam a infiltração celular. Face a este problema, pretende-se aumentar o tamanho de poro através da incorporação de grãos numa membrana eletrofiada, para expandir a rede fibrosa e permitir a migração e distribuição uniforme das células. Esta abordagem é aplicada no âmbito da regeneração da pele, visto que os substitutos comercializados não apresentam uma solução eficaz para os defeitos anatómicos, funcionais e estéticos cutâneos.

Recorrendo à eletrofiação simultânea de duas soluções, foram produzidas membranas de fibras de policaprolactona, um polímero sintético biodegradável, com grãos de quitosano incorporados, um polímero natural acelerador da regeneração da pele, de granulometria e concentração variável. Posteriormente as membranas foram caracterizadas fisicamente quanto à morfologia, propriedades mecânicas, porosidade e permeabilidade ao vapor de água, e biologicamente quanto à adesão, proliferação e infiltração celular.

A análise morfológica confirmou a integração dos grãos nas membranas. Segundo os ensaios mecânicos e de permeabilidade estas podem-se considerar aptas para a aplicação cutânea. Na análise porosimétrica projetou-se um sistema de montagem, que visa implementar o método do ponto de bolha, para determinar o tamanho médio de poro. Com o sistema construído realizaram-se os primeiros testes em membranas de filtros, alcançando-se valores de poro relativamente próximos aos esperados. Quanto aos ensaios *in vitro*, as células aderiram e proliferaram a taxas mais baixas que no controlo, e foram encontradas preferencialmente à superfície das membranas.

As várias composições dos grãos nas membranas não produziram resultados diferentes, não sendo por isso um fator determinante. O trabalho realizado permitiu progressos na questão da expansão de poros de uma estrutura fibrosa.

Palavras-chave: Infiltração celular, Eletrofiação, Pele, Grãos de Quitosano, Tamanho Médio de Poro, Policaprolactona.

ABSTRACT

Tissue Engineering has explored several techniques for the production of three-dimensional porous structures that resemble the *in vivo* conditions to which cells are subjected, in order to promote tissue regeneration. The electrospinning technique produces fibrous scaffolds with high porosity but with small pores, making cell infiltration difficult. Concerning this problem, the aim is to increase the pore size by incorporating particles into an electrospun mat, to expand the fibrous mesh and facilitate migration and uniform distribution of cells. This approach is applied to the field of skin regeneration, given the lack of an effective solution for anatomical, functional and aesthetic skin defects.

For this purpose, two solutions were simultaneously electrospun producing fiber membranes of polycaprolactone, a biodegradable synthetic polymer, and chitosan particles, a natural skin regeneration accelerator polymer, of varying grain size and concentration. Afterwards, the membranes were physically characterized in terms of morphology, mechanical properties, porosity and permeability to water vapor, and biologically in terms of cell adhesion, proliferation and infiltration.

Morphological analysis confirmed the integration of particles into the membranes. According to the mechanical and permeability tests, these membranes can be considered apt for cutaneous application. For the porosimetry analysis, a system was designed to implement the bubble point method so that the average pore size could be determined. With the system developed, it was possible to perform the first tests on filter membranes, reaching pore values relatively close to those expected. As for the *in vitro* assays, the cells adhered and proliferated at lower rates than the cell control and were found preferentially at the surface of the membranes.

The different compositions of the particles on the membranes did not produce divergent results, being therefore not a determining factor. This project provided progress in the thematic of pore expansion of a fibrous scaffold.

Keywords: Cellular Infiltration, Electrospinning, Skin, Chitosan Particles, Mean Pore Size, Polycaprolactone.

ÍNDICE

Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xix
Lista de Siglas	xxi
1 Introdução	1
1.1 Contextualização e Motivação	1
1.2 Objetivos	2
1.3 Estrutura da Dissertação	3
2 Enquadramento Teórico	5
2.1 Pele	5
2.1.1 Anatomia e Fisiologia	5
2.1.2 Feridas e mecanismos de cicatrização	7
2.1.3 Tratamentos de feridas	8
2.2 Engenharia de Tecidos	9
2.3 Eletrofiação	12
2.3.1 Técnicas de expansão de poros	13
2.4 Biomateriais	17
2.4.1 Polímeros	17
2.4.1.1 Policaprolactona	18
2.4.1.2 Quitosano	18
2.4.1.3 Poli(óxido de etileno)	20
2.4.1.4 Combinação: Policaprolactona e Quitosano	21
3 Materiais e Métodos	23
3.1 Materiais e Soluções	23
3.1.1 Preparação das Soluções	24
3.2 Métodos de Produção das Matrizes	26
3.2.1 Montagem Experimental	27

3.3	Métodos de Caracterização das Matrizes	29
3.3.1	Análise Morfológica	29
3.3.2	Ensaio de Tração	29
3.3.3	Ângulo de Contacto	31
3.3.4	Tamanho Médio de Poro	32
3.3.5	Permeabilidade ao Vapor de Água	35
3.4	Testes <i>In Vitro</i>	36
3.4.1	Cultura Celular: HFFF2	36
3.4.2	Viabilidade Celular	38
3.4.3	Morfologia Celular	39
3.4.4	Infiltração Celular	40
4	Apresentação e Análise de Resultados	43
4.1	Produção e Caracterização das Matrizes	43
4.1.1	Análise Morfológica	44
4.1.2	Ensaio de Tração	53
4.1.3	Ângulo de Contacto	55
4.1.4	Tamanho Médio de Poro	56
4.1.5	Permeabilidade ao Vapor de Água	58
4.2	Testes <i>In Vitro</i>	60
4.2.1	Viabilidade Celular	60
4.2.2	Morfologia Celular	63
4.2.3	Infiltração Celular	67
5	Conclusão	69
5.1	Conclusões gerais	69
5.2	Trabalho futuro	71
	Referências Bibliográficas	73
I	<i>Electrospray</i> de micropartículas de CS	85
II	Desenho Técnico	87
III	Protocolos de Cultura de Células	89
IV	Membrana de PCL+PEO+CS100-0 com 10%CS	93

LISTA DE FIGURAS

2.1	Diagrama esquemático da estrutura normal da pele.	6
2.2	Mecanismos de cicatrização.	7
2.3	Substitutos de pele.	9
2.4	Imagens microscópicas de matrizes produzidas por liofilização (A, B) e eletro- fiação (C, D)	11
2.5	Esquema do sistema de montagem da técnica de eletrofiação.	12
2.6	Esquema de polimerização da policaprolactona a partir da ϵ -caprolactona. . .	18
2.7	Composição e síntese do quitosano.	19
2.8	Esquema de polimerização do poli(óxido de etileno) a partir do óxido de etileno.	20
2.9	Imagens microscópicas da morfologia de alguns <i>scaffolds</i> resultantes da com- binação PCL/CS, documentadas na literatura.	21
3.1	Imagens dos modelos dos equipamentos usados na obtenção dos grãos de CS nas diferentes granulometrias.	25
3.2	Aparência das soluções poliméricas preparadas para a produção das matrizes.	26
3.3	Materiais, equipamentos e configuração experimental adotados no processo de co-eletrofiação para a produção das matrizes.	28
3.4	Microscópios usados na caracterização morfológica das membranas.	29
3.5	Curva típica de um polímero submetido ao ensaio de tração.	30
3.6	Equipamento usado na caracterização mecânica das membranas.	31
3.7	Equipamento e software utilizados na caracterização da hidrofiliicidade das membranas.	32
3.8	Representação esquemática da formação do ângulo de contacto, θ	32
3.9	Gráfico obtido na caracterização do tamanho de poro, pelo método do ponto de bolha, e imagens ilustrativas do fenómeno.	33
3.10	Imagens do esquema, da montagem e das peças de suporte usadas para a implementação do sistema de caracterização do tamanho médio de poro, pelo método do Ponto de Bolha.	34
3.11	Frascos de vidro cobertos pelas membranas produzidas por co-eletrofiação. .	35
3.12	Imagem microscópica de fibroblastos da linha celular HFFF2, aderidos à su- perfície de um frasco de cultura.	37
3.13	Amostras e materiais usados para a cultura de células sobre as matrizes. . . .	37

3.14	Redução da resazurina a rezorufina por células metabolicamente ativas. . . .	38
3.15	Espetros de absorção da resazurina e resorufina.	39
3.16	Espetros de fluorescência do DAPI e da calceína.	40
3.17	Lâminas de vidro usadas na recolha dos cortes com diferentes espessuras. . .	40
4.1	Imagem macroscópica do CS.	44
4.2	Imagens de microscopia ótica dos grãos de CS.	45
4.3	Fibras de PCL depositadas a partir de uma solução preparada em diferentes solventes.	46
4.4	Fibras de PEO a de uma solução preparada com uma mistura de água e etanol.	46
4.5	Co-eletrofiação das soluções de PCL e de PEO+CS, preparadas em diferentes solventes.	47
4.6	Superfície das membranas produzidas pela eletrofiação de PCL e co-eletrofiação de PCL e PEO+CS.	48
4.7	Imagens de MEV da membrana de PCL.	49
4.8	Representação gráfica da distribuição dos diâmetros das fibras de PCL. . . .	49
4.9	Imagens de MEV das membranas de PCL+PEO+CS com variação da granulometria dos grãos de CS.	51
4.10	Imagens de MEV das membranas de PCL+PEO+CS com variação da concentração dos grãos de CS.	52
4.11	Imagens de MEV de membranas de PCL+PEO+CS sem as fibras de PCL (PEO+CS) e sem as fibras de PEO (PCL+CS), depois de dissolvidas em água.	52
4.12	Tração de uma amostra de PCL e de PCL+PEO+CS1:3.	53
4.13	Curvas de tração típicas para as diferentes membranas.	54
4.14	Curvas experimentais do método do ponto de bolha aplicado às amostras de filtros.	57
4.15	Curvas experimentais do método do ponto de bolha aplicado às membranas produzidas.	58
4.16	Representação da evolução da transmissão de vapor de água de cada membrana ao longo de 10 h.	59
4.17	Representação da população relativa das células HFFF2 nas diferentes membranas, em função do tempo de cultura.	62
4.18	Imagens de MEV das células HFFF2 aderidas às membranas produzidas. . .	63
4.19	Imagens de microscopia de fluorescência da superfície das membranas com as células HFFF2 marcadas com DAPI, para diferentes tempos de cultura. . . .	64
4.20	Imagens de microscopia de fluorescência da face de baixo das membranas com as células HFFF2 marcadas com DAPI.	65
4.20	Imagens de microscopia de fluorescência da superfície das membranas com células HFFF2 marcadas com calceína.	66
4.21	Imagens de microscopia de fluorescência de marcação com DAPI dos cortes histológicos das membranas semeadas com HFFF2, ao fim de 14 dias de cultura.	67

4.22	Imagens de microscopia confocal de varrimento a laser de amostras de PCL+CS, após 20 dias de cultura de HFFF2 marcadas com calceína.	68
I.1	Configuração experimental adotada no <i>electropray</i> de uma solução de CS para a produção de micropartículas.	85
I.2	Imagens de microscopia ótica das micropartículas de CS formadas pelo método de <i>electrospray</i> , para diferentes tensões.	86
I.3	Representação gráfica dos diâmetros das micropartículas de CS em função da tensão aplicada.	86
II.1	Desenho técnico das vistas ortográficas da peça de suporte usada nos ensaios do ponto de bolha.	87
IV.1	Imagens de microscopia eletrônica de varrimento da membrana de PCL+PEO+CS com 10% de CS.	93

LISTA DE TABELAS

2.1	Técnicas aplicadas na resolução do problema de matrizes com poros adequados à infiltração celular.	16
3.1	Composição das soluções PCL e PEO.	24
3.2	Composição das soluções de PEO+CS.	24
3.3	Parâmetros de co-eletrofiação usados nas soluções para a produção das matrizes.	27
4.1	Valores obtidos para a densidade das diferentes concentrações das soluções usadas na produção das matrizes.	44
4.2	Módulo de Young para as diferentes matrizes.	54
4.3	Ângulo de contacto obtido para as diferentes amostras preparadas.	55
4.4	Média dos valores obtidos do tamanho médio de poro para os diferentes filtros.	57
4.5	Taxa de transmissão de vapor de água (WVTR) para cada membrana.	59
4.6	Adesão celular relativa determinada para cada membrana, após 24h de cultura.	61
4.7	Resultados da significância estatística para as membranas de PCL e de PCL+CS 1:0,5.	62

LISTA DE SIGLAS

AA	Ácido Acético glacial.
CS	Quitosano.
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol.
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium.</i>
FBS	<i>Foetal Bovine Serum.</i>
HFFF2	<i>Human Caucasian foetal foreskin fibroblast.</i>
MEC	Matriz Extracelular.
MEV	Microscopia Electrónica de Varrimento.
OCT	<i>Optimum Cutting Temperature.</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline.</i>
PCL	Policaprolactona.
PEO	Poli(óxido de etileno).
PFA	Paraformaldeído.
WVTR	<i>Water Vapour Transmission Rate.</i>

INTRODUÇÃO

A pele é a “peça-de-roupa” que mais nos caracteriza. Como um dos principais órgãos do corpo humano, a pele reflete vários estados de saúde e emocionais do nosso organismo. Ao mesmo tempo serve de fronteira entre o interior e o meio ambiente, ditando, em parte, a forma como interagimos com o mundo. Todavia, este revestimento faz muito mais do que nos mostrar apresentáveis.

No âmbito de contribuir para trabalhos futuros que pretendem melhorar, ou inclusive, inovar soluções terapêuticas para problemas de pele, este estudo pretende desenvolver uma membrana de nanofibras com características potenciais de um substituto da camada dérmica.

1.1 Contextualização e Motivação

A pele atua como barreira de proteção e como defesa do organismo contra agentes externos, sendo também responsável pela regulação e controlo de diversos mecanismos fisiológicos [1]. Com estes aspetos é possível perceber a importância vital de uma pele saudável. A elevada exposição deste órgão ao exterior torna-o suscetível a lesões que levam à sua disfunção. Queimaduras, infeções e úlceras são algumas das principais situações que envolvem perda da integridade e viabilidade deste órgão. Em casos mais graves, o processo de reparação não é adequado, podendo dar origem a lesões crónicas ou até mesmo levar à morte [1, 2].

Estima-se que a cada cinco segundos uma pessoa sofre queimaduras graves. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2004 registaram-se aproximadamente 11 milhões de pessoas severamente queimadas, necessitando de cuidados médicos especializados [3, 4]. Perante a prevalência destes casos, acrescido ao impacto negativo na qualidade de vida do indivíduo, surge a preocupação em desenvolver soluções para a

reconstituição da pele. Face a esta situação, para a pele têm sido desenvolvidos inúmeros substitutos que estão clinicamente disponíveis. Quer sejam transplantes de pele, quer sejam substitutos artificiais, cada uma destas soluções procura estimular a regeneração funcional e estética do órgão. Apesar da panóplia de substitutos cutâneos comercializados para o tratamento de feridas, atualmente não há nenhum que cumpra totalmente estes requisitos.

Dado este cenário, a pele continua a despertar grande interesse por parte da comunidade científica na procura de abordagens com resultados mais promissores. É neste sentido que a Engenharia de Tecidos tem trazido grandes progressos ao tratamento da pele. Esta área debruça-se em alternativas às técnicas tradicionais de enxertos, no desenvolvimento de estruturas biológicas para a substituição de tecidos. Utiliza por base biomateriais que podem ser combinados com células e moléculas bioativas. Por meio destes elementos, são adotadas estratégias na produção de estruturas tridimensionais porosas, os *scaffolds*. Através destes pretende-se promover a integração de células, estimulando e assegurando o crescimento do tecido danificado. Para isso, os *scaffolds* são projetados a reproduzir as propriedades mecânicas e funcionais da Matriz Extracelular (MEC) do tecido. No meio de diversos métodos de produção de *scaffolds*, destaca-se a eletrofição (*electrospinning*) como sendo a técnica com melhor capacidade de produzir uma estrutura semelhante à arquitetura da MEC nativa. O resultado final consiste numa matriz, altamente porosa, de fibras com diâmetros na escala dos nanómetros a micrómetros [5].

Embora esta abordagem se revele bastante otimista, é condicionada pelo tamanho reduzido dos poros. Como consequência, a infiltração celular bem como a difusão de substâncias, são dificultadas, comprometendo a ação regenerativa dos tecidos [5]. Por este motivo é extremamente importante a existência de poros e canais interconectados. É na expectativa de ultrapassar esta limitação, que o presente trabalho se insere na análise deste determinante estrutural dos *scaffolds*, o tamanho de poro.

1.2 Objetivos

Os objetivos principais para este estudo consistem em:

- Criar poros de tamanho adequado e canais interconectados nas matrizes 3D poliméricas produzidas pela técnica de eletrofição, e caracterizar as propriedades físicas das respetivas membranas;
- Analisar *in vitro*, o comportamento de adesão, proliferação e migração de células fibroblásticas semeadas nas matrizes sob efeito do aumento do calibre dos poros.

O grande desafio encontra-se na expansão de poros e na criação de condutas de ligação com características que mimetizam a MEC da pele. Através do alargamento estratégico dos poros de um *scaffold* produzido por eletrofição, pretende-se obter uma matriz que

favoreça a migração das células por todo o volume da estrutura. Para tal, serão incorporados grãos de Quitosano (CS, *Chitosan*) de diferentes granulometrias em matrizes fibrosas de Policaprolactona (PCL, *Polycaprolactone*). Adicionalmente será utilizado Poli(óxido de etileno) (PEO, *Poly(ethylene oxide)*), um polímero solúvel em água, para transportar os grãos de CS. Com a dissolução das fibras deste veículo polimérico serão formados espaços vazios no seu lugar. Aliando os poros induzidos pelos grânulos de CS e os canais de ligação pela dissolução de fibras de PEO, espera-se obter uma matriz com poros altamente favoráveis à proliferação e adesão celular. Assim, com recurso à técnica de eletrofiação, será produzida uma matriz com a integração de dois polímeros biocompatíveis e biodegradáveis na sua composição. Espera-se alcançar poros com dimensões na ordem das dezenas de micrómetros, documentado na literatura como sendo o espaço necessário favorável à infiltração celular de fibroblastos [6].

Para uma avaliação do êxito das matrizes desenvolvidas, serão realizadas sementeiras de fibroblastos sobre estas. Pretende-se que estes atravessem a matriz e não fiquem retidos à superfície. De modo a determinar a distribuição das células no interior das matrizes, recorrer-se-á a técnicas de histologia.

Posto isto, são estipuladas técnicas e estratégias para estruturar uma matriz com condições propícias à regeneração natural da pele.

1.3 Estrutura da Dissertação

A dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos, organizada da seguinte forma:

Capítulo 1: Introdução – Apresenta sumariamente o panorama atual do trabalho desenvolvido nesta dissertação, a par dos objetivos traçados e da sua organização. Nesta secção pretende-se dar uma noção base no plano de fundo em que se insere o problema em questão.

Capítulo 2: Enquadramento Teórico – Explicita os princípios e conceitos teóricos da pele e de toda a envolvente da Engenharia de Tecidos aplicada à pele. É feita uma compilação de informação necessária à compreensão da temática abordada na dissertação, com foco no conjunto de técnicas de expansão de poros por eletrofiação relatados na literatura. São introduzidos ainda os biomateriais utilizados na componente prática do trabalho.

Capítulo 3: Procedimento Experimental – Descreve a metodologia aplicada para a conceção de uma matriz como proposta de solução para o problema, isto é, com propriedades que visam proporcionar o ambiente necessário à invasão das células. Este capítulo centra-se na preparação das soluções, nas especificações da montagem experimental, nos métodos de caracterização das matrizes e nos ensaios *in vitro* das culturas celulares.

Capítulo 4: Resultados e Discussões – Expõe e discute os resultados obtidos, com o intuito de avaliar a influência do aumento do tamanho de poro nas características e na atividade celular das matrizes eletrofiadas.

Capítulo 5: Conclusão - Aborda as conclusões gerais e os aspetos a melhorar nos problemas ainda por resolver, de modo a contribuir com sugestões para trabalhos futuros.

ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1 Pele

2.1.1 Anatomia e Fisiologia

A pele compõe cerca de 5,5% da massa corporal e abrange uma superfície aproximada de $1,7 \text{ m}^2$, para uma pessoa com 70 kg [7]. Para além de ser considerada dos maiores órgãos do corpo humano, também é reconhecida pela sua versatilidade. Ela estende-se por toda a superfície, cobrindo o interior do organismo, e detém propriedades essenciais na manutenção da homeostasia e na proteção dos tecidos subjacentes. Mais precisamente, a pele atua como um escudo contra agentes químicos, físicos e biológicos evita a perda de fluídos mantendo a hidratação adequada, e ajuda a regular a temperatura corporal. Possui ainda terminações nervosas responsáveis pela perceção sensorial. A pele constitui, assim, a primeira linha de defesa no combate a agressões exteriores ao alertar o sistema imunitário, sendo um órgão metabolicamente ativo no desempenho de todas estas condições imprescindíveis à atividade funcional do organismo [8, 9].

Em termos da sua constituição, a pele possui duas camadas: a epiderme e a derme (Figura 2.1) [7]. É ainda composta por pelos presentes em quase todas as regiões do corpo, e glândulas sebáceas e sudoríparas. Estas estruturas anexas pertencentes à derme contribuem para a manutenção das funcionalidades da pele, como é o caso das glândulas sudoríparas que controlam a temperatura corporal por meio da transpiração. Abaixo da pele encontra-se a hipoderme, uma camada formada por tecido adiposo, encarregue por diversas tarefas que dão suporte à pele, entre as quais, o armazenamento de energia e a proteção dos órgãos internos pelo amortecimento de agressões externas [10].

A epiderme, estrutura mais superficial, é constituída por tecido epitelial estratificado. É uma camada povoada maioritariamente por queratinócitos que se encontram num processo constante de proliferação e diferenciação, denominado queratinização. Este ciclo de

regeneração celular torna possível a autorrenovação da epiderme. Outros tipos de células presentes são os melanócitos e as células *Langerhans*, que filtram a radiação ultravioleta e integram o sistema imunitário, respetivamente [10].

A derme é mais espessa e situa-se abaixo da epiderme. É formada por tecido conjuntivo que suporta terminações nervosas, vasos sanguíneos e vasos linfáticos. Este tecido é composto essencialmente por uma matriz extracelular e fibroblastos [8]. A MEC é uma rede estrutural que rodeia as células sendo rica em proteínas fibrosas, maioritariamente colagénio e elastina, em polissacáridos, os glicosaminoglicanos, em proteoglicanos e glicoproteínas. Além destas macromoléculas conferirem estabilidade mecânica e elasticidade à pele, têm um papel ativo no comportamento celular. Enquanto que os fibroblastos sintetizam grande parte destes componentes biológicos, a MEC regula diversos processos celulares, como a migração, proliferação e ancoragem das células, etc. É graças à interação entre as células e a MEC que se cria um microambiente complexo e dinâmico, indispensável à atividade do tecido e à cicatrização de lesões [9, 11].

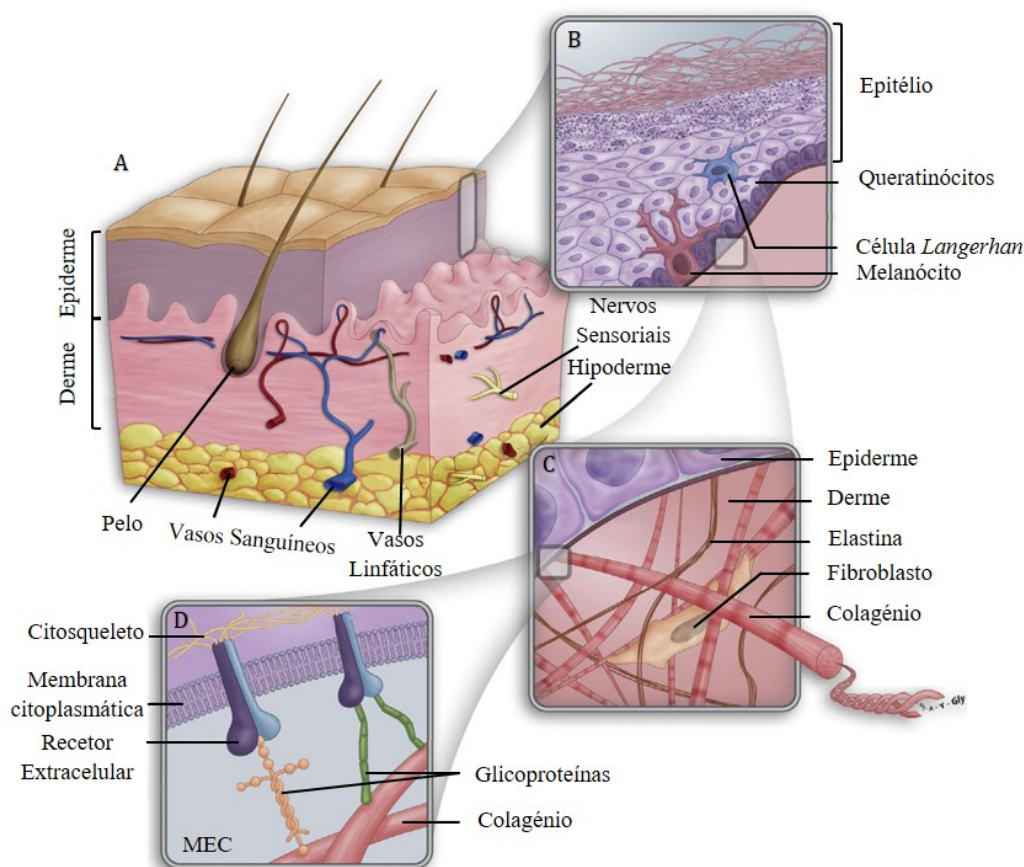


Figura 2.1: Diagrama esquemático da estrutura normal da pele. (A) Principais constituintes da pele, a epiderme, a derme, e a camada subjacente, a hipoderme. (B) Epiderme, camada celular altamente organizada e estratificada. (C) Estrutura entrelaçada de fibras que compõe a derme, e os seus principais componentes. (D) Rede da matriz extracelular em interface com uma célula, interligados por recetores localizados à superfície da célula. (Adaptado de [9]).

2.1.2 Feridas e mecanismos de cicatrização

A perda da integridade funcional da pele, provocada por lesão ou por doença, pode conduzir a distúrbios no metabolismo do tecido cutâneo. Em último caso com repercussões em termos de morbidade ou até mortalidade [2].

A principal causa de perturbações significativas na pele tem origem mais comum em queimaduras térmicas. Outras causas incluem traumatismo, úlceras crônicas, e ainda queimaduras produzidas por outros agentes etiológicos (agressão elétrica, química, etc.) [2]. Como resposta local a uma lesão da pele inicia-se o processo de cicatrização. A eficácia deste processo varia consoante o grau de severidade da lesão, que depende da extensão e espessura da camada cutânea atingida [12]. Neste sentido as feridas podem ser classificadas, quanto ao nível de profundidade, em quatro grupos [10]:

- Superficiais, em que afetam apenas a epiderme;
- Superficiais de espessura parcial, atingem uma porção inicial da derme;
- Profundas de espessura parcial, cobrem praticamente toda a camada dérmica;
- Profundas, estendem-se até à hipoderme.

Graças à presença de células epiteliais indiferenciadas, quer na última camada da epiderme quer nas estruturas anexas da derme, as feridas superficiais conseguem regenerar-se espontaneamente, por epitelização. Nas feridas de maior profundidade a cicatrização da pele é guiada por um conjunto de etapas, ocorrendo reparação da ferida por contração e por síntese de nova MEC (Figura 2.2). Nesta situação, a organização e densidade das fibras de colagénio diferem da pele natural, formando-se uma cicatriz. Este mecanismo assenta na interação entre diversos componentes celulares e moleculares, que atuam na tentativa de recuperar a estrutura e função originais do tecido [9, 12].

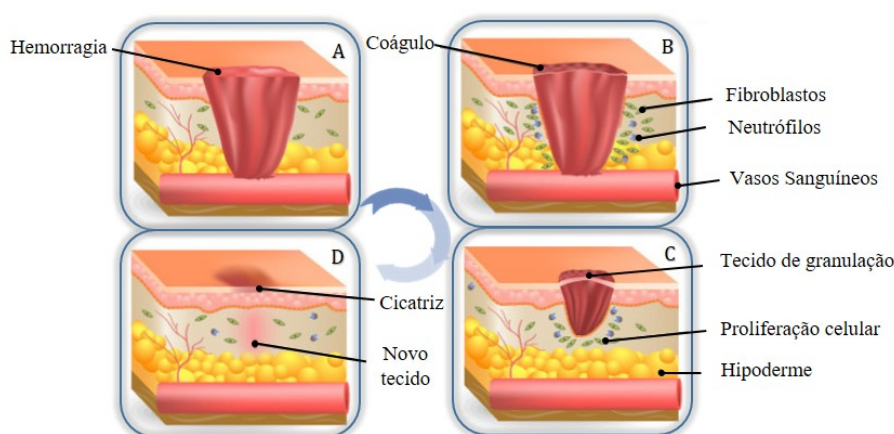


Figura 2.2: Mecanismos de cicatrização. (A) Após a lesão inicia-se a fase hemostática com a formação de um coágulo para parar a hemorragia resultante da rutura dos vasos sanguíneos. (B) Segue-se a fase inflamatória que envolve o recrutamento de células. (C) Na fase proliferativa os fibroblastos estimulam a angiogénese, e sintetizam uma matriz provisória, formando-se o tecido de granulação. (D) Por fim ocorre a maturação, caracterizada pelo aumento da resistência do novo tecido e pela formação de uma cicatriz [1, 9, 10]. (Imagens retiradas de <https://livelymoor.wordpress.com/2016/07/09/wound-healing-phases/> consultado em 19/08/2018).

Desta via podem resultar cicatrizes pronunciadas, feridas crónicas que dificilmente curam, entre outras complicações. Na possibilidade do indivíduo correr risco de vida, são recomendados cuidados médicos especializados para restaurar o tecido danificado [1, 10].

2.1.3 Tratamentos de feridas

Atualmente existe uma grande diversidade de abordagens terapêuticas que procuram a regeneração perfeita da pele. Dependendo da gravidade da lesão, é aplicado o tratamento com melhores recomendações ao respetivo estado da ferida. Diversos fatores, como a localização, profundidade, extensão, presença de infeção, entre outros, têm peso nessa mesma escolha [13].

O tratamento padrão para feridas profundas e extensas é o autoenxerto de espessura parcial da pele. Este consiste na recolha de epiderme e uma porção da camada dérmica, em zonas sãs do próprio indivíduo. Analogamente às lesões superficiais, a região da-dora consegue sarar dentro de 7 a 14 dias. No entanto, nos casos em que a lesão cobre mais de 50% da superfície da pele, a área disponível para o enxerto torna-se escassa[10]. Uma possibilidade está em expandir as células com técnicas de cultura celular *in vitro* a partir de uma biópsia, de forma a obter um número de células suficiente para tratar a lesão. Porém o tempo de espera é muito longo e o custo de produção elevado [14]. Outra opção é o aloenxerto, isto é, transplante entre indivíduos geneticamente diferentes da mesma espécie, ou o xenoenxerto, entre espécies diferentes. Apesar de ser uma alternativa ao autoenxerto, apresenta o risco de reação imunológica e ainda a transmissão de doenças [10, 12].

Numa perspetiva de contornar estas limitações têm-se desenvolvido substitutos de pele, tanto para feridas agudas (queimaduras) como para crónicas (úlceras), que cumpram esta necessidade médica não atendida [15]. Diversas são as características ótimas requeridas num substituto, nomeadamente, ser estéril, biocompatível, resistente a infeções e agentes tóxicos, permeável ao vapor de água, ter uma resposta inflamatória reduzida e uma taxa de degradação controlada. Deve também aderir rapidamente à superfície da ferida, ser capaz de restaurar permanentemente as propriedades biomecânicas, bem como todas as outras estruturas e funções da pele nativa, minimizando a formação de cicatriz. Clinicamente, espera-se ainda que seja acessível, fácil de manusear e aplicar a qualquer irregularidade, pronto a ser usado, eficaz e relativamente barato [1, 13, 15].

O leque de substitutos de pele é tão vasto que estes podem ser caracterizados segundo vários parâmetros. Quanto à sua estrutura anatómica dividem-se em epidérmicos, dérmicos ou compostos (derme e epiderme). Podem também ser classificados em termos da duração (temporários ou permanentes), da presença de células (celulares ou acelulares), e do tipo de biomaterial (natural ou sintético) [10].

O Integra® (Figura 2.3a) foi o primeiro substituto dérmico artificial utilizado na prática clínica [12]. Este consiste numa matriz à base de colagénio produzida por liofilização, para promover a proliferação celular na derme, e numa membrana protetora de silicone servindo de barreira temporária a invasores. Apesar dos bons resultados estéticos e funcionais a longo prazo, tem implicações no que toca à necessidade de duas cirurgias, à suscetibilidade a infeções, ao custo comparativamente aos transplantes autólogos, entre outros [1, 16].

Exemplos de substitutos epidérmicos incluem o Epicel® e o Laserskin®. O Apligraf® (Figura 2.3b) e OrCel® são alguns dos substitutos compostos mais comuns. Cada um dos substitutos, nas suas especificidades, apresenta características benéficas bem como desvantagens. Por exemplo, problemas associados à contração da ferida, formação de cicatriz, má integração com o tecido lesado, preço elevado, entre outros. Ainda que os produtos disponíveis no mercado tenham qualidades ao ponto de serem aprovados comercialmente, até ao momento não há um que assegure o desenvolvimento e funcionamento do tecido na íntegra [1, 17].



(a) Integra®



(b) Apligraf®

Figura 2.3: Substitutos de pele. (a) Dérmico. (b) Composto.

2.2 Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos é uma área multidisciplinar com a finalidade de restaurar, substituir, ou melhorar a função de tecidos e órgãos danificados. Especializa-se no desenvolvimento de estruturas biológicas a serem inseridas no corpo humano [18]. Tem sido aplicada a vários órgãos demonstrando uma redução no número de transplantes realizados. A sua contribuição para a pele tem revolucionado a abordagem terapêutica das feridas cutâneas. De facto, a pele é o órgão pioneiro sujeito aos princípios desta área [1]. Neste panorama, o amplo espectro de substitutos cutâneos evidencia o esforço realizado pela comunidade científica neste propósito.

Os principais intervenientes na produção destes substitutos são os *scaffolds* e as células. Os *scaffolds* são matrizes artificiais que fornecem suporte estrutural às células. Estas, por sua vez, têm a capacidade de formar novo tecido [19]. Ambos desempenham papéis fulcrais na criação das condições necessárias à regeneração dos tecidos. Posto isto, a abordagem típica da Engenharia de Tecidos encontra-se na combinação de *scaffolds* e células [20]. Há ainda a possibilidade de incorporar moléculas bioativas. Tratam-se de fatores de crescimento que se ligam a recetores específicos na superfície das células, e transmitem sinais responsáveis por controlar os processos celulares necessárias à atividade reconstrutiva do tecido [21].

- **Células:**

As células são semeadas *in vitro* nos *scaffolds*, que se destinam a recriar o ambiente nativo a que as mesmas estão sujeitas. Pretende-se que estas povoem todo o volume da estrutura. Nestas condições, é criado o cenário propício à proliferação e preservação do fenótipo das células. Como resultado, as células são estimuladas a construir a matriz extracelular e todos os outros alicerces do tecido a regenerar [18, 19].

- **Scaffolds:**

Considerando o impacto deste suporte na formação de tecidos, é de realçar a influência da sua composição e arquitetura no crescimento e sobrevivência das células [19]. Ao interagir com os sistemas biológicos é fundamental que o material seja biodegradável, degradando-se à medida que as células produzem a própria matriz extracelular, e biocompatível para não induzir rejeição por parte do sistema imunitário. Os outros aspetos a ter em consideração no *scaffold* são as suas propriedades porosas, mecânicas e tridimensionais. Idealmente, o *scaffold* deve manter a integridade mecânica, desde o momento de implantação até à conclusão do processo de regeneração. Ainda de importância crítica é a organização espacial da estrutura. A existência de poros e da interligação entre estes são condições essenciais para garantir a infiltração celular e a difusão de nutrientes e resíduos, além de facilitar a vascularização. Posto isto, o tamanho de poro adequado é um fator decisivo no sucesso do *scaffold* [20, 21]. Deve-se ter em conta que o poro não pode ser muito grande ao ponto de não haver superfície de ancoragem para as células, nem demasiado pequeno, para não bloquear a migração das células nem a transferência de substâncias, e consequentemente impedir a produção de MEC e a regeneração do tecido. Segundo a literatura, estudos demonstraram um tamanho ótimo de poro de 5-15 μm , para a migração de fibroblastos [6].

Todos estes requisitos que um *scaffold* deve manter, definem os esforços da Engenharia de Tecidos em imitar a matriz extracelular dos tecidos do organismo. Estes esforços são baseados na hipótese de que através de um *scaffold*, o mais semelhante à MEC nativa, se obtém um microambiente apropriado às reações intercelulares e respostas intracelulares essenciais nos processos fisiológicos e patológicos [5, 22]. O desafio está na manipulação de todos os parâmetros acima mencionados, a fim de se otimizar a estrutura.

Diversos são os métodos desenvolvidos na produção de *scaffolds*. Alguns destes incluem impressão 3D, laminação e moldagem por fusão [16, 21]. Entre os mais utilizados na engenharia da pele pode-se referir a liofilização (Figura 2.4A-B) [17]. Qualquer um dos processos procura nas suas particularidades construir uma estrutura com as características mais desejadas à aplicação alvo [18]. No entanto estes apresentam dificuldades em produzir fibras de diâmetros menores que 10 μm , o que não coincide com a espessura das fibras da MEC original que se encontram na ordem dos nanómetros (50-500 nm). Com o objetivo de simular a geometria da MEC as técnicas mais adequadas na produção de nanofibras são: a auto-montagem, a técnica de separação de fases e a eletrofiação (Figura 2.4C-D). Destas três, a última destaca-se pela sua simplicidade, eficiência e custo reduzido em obter fibras nas proporções de interesse. Comparativamente às restantes, esta técnica permite ainda um maior controlo sobre as propriedades morfológicas da matriz, e a utilização de uma maior variedade de polímeros como matéria-prima [22, 23]. Assim, a eletrofiação emerge como a técnica com maior êxito no alcance das metas da cicatrização de feridas da pele [17].

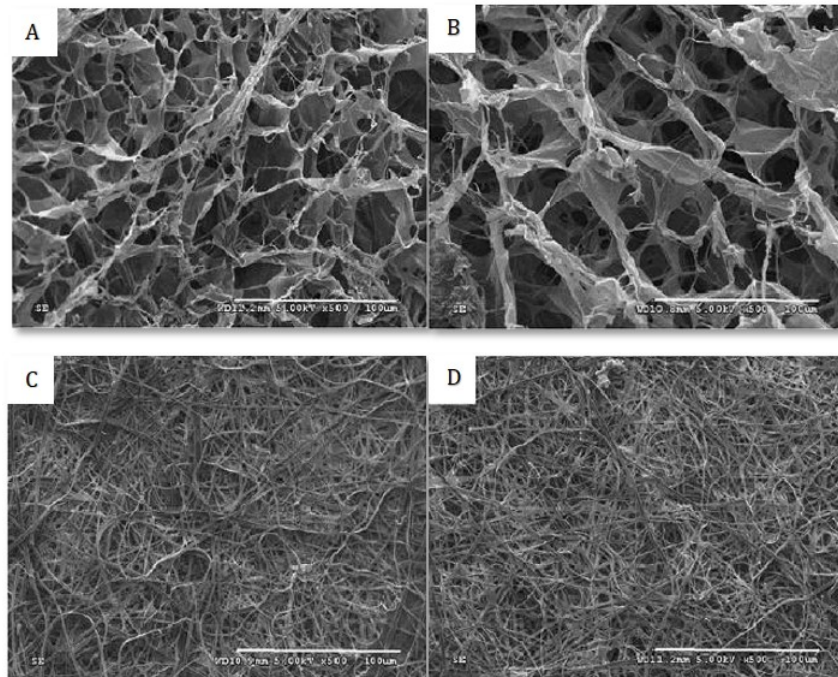


Figura 2.4: Imagens microscópicas de matrizes produzidas por liofilização (A, B) e eletrofiação (C, D). Imagens por Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) de diferentes regiões de matrizes de colagénio, com diferenças na morfologia da estrutura. Escala 100 μm . (Retirado de [23]).

2.3 Eletrofiação

A origem da eletrofiação como uma técnica de fiação de fibras viáveis remonta ao início do século XX. Até à data tem sofrido contínua evolução e aperfeiçoamento, constituindo presentemente uma técnica auspiciosa na área da Engenharia de Tecidos [24].

Na prática, a eletrofiação processa uma solução polimérica e transforma-a numa construção fibrosa, utilizando forças electroestáticas. A configuração experimental tipicamente, envolve uma tensão na ordem dos kV aplicada a um capilar, uma agulha na extremidade da seringa (Figura 2.5) [25]. A seringa por sua vez contém uma solução polimérica, cujo caudal é controlado por um sistema de bomba que empurra o êmbolo da seringa e forma uma gota suspensa na ponta [26]. Quando o capilar é polarizado, a solução polimérica é carregada eletricamente, e a gota alonga pelo efeito do campo elétrico, adquirindo uma geometria cônica conhecida por cone de Taylor. À medida que a tensão aumenta, atinge-se o ponto em que a força electroestática de repulsão supera a tensão superficial da gota, e um fio de solução é acelerado em direção ao coletor, que se encontra ligado à terra e a uma distância fixa da agulha. Neste trajeto, entre a ponta do capilar e o coletor, o jato é estirado pelas forças do campo elétrico e ocorre a evaporação do solvente ficando apenas retido o polímero. O resultado da projeção contínua de fibras de base polimérica, de diâmetros que variam dos nanómetros aos micrómetros, é uma matriz tridimensional [25, 27].

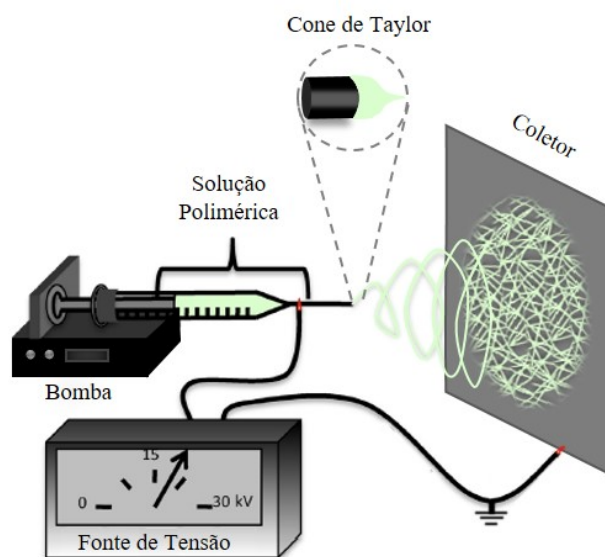


Figura 2.5: Esquema do sistema de montagem da técnica de eletrofiação. (Adaptado de [28]).

Embora a eletrofiação seja marcada pela sua simplicidade, existem diversos parâmetros que influenciam as propriedades das fibras. Desde a (i) viscosidade, (ii) tensão superficial e (iii) condutividade, relativos à solução; à (i) tensão aplicada, (ii) caudal da solução, (iii) distância entre a agulha e o coletor, (iv) configuração do coletor, referentes

ao processo; e ainda fatores ambientais como a (i) temperatura e (ii) humidade relativa. É através de variações nestes parâmetros que se consegue algum controlo nas propriedades morfológicas, mecânicas e porosas, e no diâmetro das fibras [25, 29].

Dentro dos padrões da eletrofiação, obtém-se um *scaffold* altamente poroso, com poros interconectados e uma área de superfície elevada, o que é desejável à adesão e proliferação celular [25]. No entanto, a natureza caótica da deposição das fibras camada sobre camada, resulta numa estrutura densamente compactada com poros muito pequenos, responsável por impedir a infiltração das células. Uma vez restringida a infiltração, as células não têm forma de migrar e invadir o *scaffold*, dificultando o crescimento de tecido [29]. É neste panorama que a eletrofiação encontra uma grande limitação. Para ultrapassar este problema, estudos recentes procuram promover a infiltração de células através de modificações estratégicas na eletrofiação dos *scaffolds* [30].

2.3.1 Técnicas de expansão de poros

Diversas técnicas têm sido exploradas com diferentes especificações, desde a simples alteração dos parâmetros da eletrofiação, a metodologias mais complexas.

I. Ajuste dos parâmetros da eletrofiação

A forma mais direta de dominar o tamanho dos poros envolve o ajuste dos parâmetros da eletrofiação acima referidos. Como muitos autores têm vindo a reportar, o aumento do diâmetro das fibras é acompanhado pelo aumento do tamanho dos poros [25, 31]. À luz desta descoberta, Jelena Rnjac-Kovacina *et al.* [32] procuraram aumentar a porosidade do *scaffold* e o tamanho dos poros utilizando diferentes caudais na eletrofiação. De acordo com os resultados, observaram uma correlação entre o caudal da solução e a dimensão dos poros. Por fim, verificaram que esta relação se devia ao aumento do diâmetro das fibras com o aumento do caudal da solução. No entanto, é de notar que o aumento das fibras leva à redução da área superficial de contacto célula-tecido. Logo, a infiltração celular é promovida, mas a adesão celular não, sendo por isso necessário um balanço entre o tamanho dos poros e o diâmetro das fibras, para garantir a integração celular adequada [5].

II. Alterações na configuração experimental padrão

Alterações na montagem da eletrofiação foram também analisadas na produção de poros largos, passando principalmente pela utilização de coletores personalizados. À parte do coletor plano retangular tradicional desta técnica, há também o coletor cilíndrico. Enquanto que o retangular acumula fibras aleatoriamente, o cilíndrico é usado preferencialmente para alinhar as deposições [25]. Numa versão mais complexa, há coletores usados como reservatórios de líquidos na recolha de nanofibras produzidas pela eletrofiação. O banho em etanol, metanol, água, ou noutro solvente, induz o efeito de dispersão das fibras aquando da sua deposição. Desta forma, é

reduzida a densidade da estrutura fibrosa e como tal, obtém-se um tamanho de poros maior e uma porosidade melhorada. Há também coletores a baixa temperatura que permitem a deposição de fibras e ao mesmo tempo a formação de partículas de gelo. No passo seguinte, as partículas integradas na matriz são retiradas por liofilização, com consequente criação de poros [30]. O ponto crítico deste método é a sincronização entre a formação das partículas de gelo e a deposição das fibras [5]. Ainda relativamente a alterações na configuração, Dawei *et al.* não utilizaram a típica agulha para ejetar a solução polimérica da seringa. Alternativamente, através de um disco eletrofiaram dezenas de jatos a partir de um suporte com a solução polimérica, em vez de apenas um como o convencional. Este formato leva a um estado de menor densidade da deposição das fibras, o que permitiu formar um *scaffold* mais folgado e, portanto, com mais canais de ligação. Ainda que os testes de proliferação indiquem ser um meio efetivo para a invasão das células [33], a sua espessura mais larga não se torna benéfica para as aplicações da Engenharia de Tecidos [5].

III. Utilização de componentes sacrificados

Uma abordagem diferente na criação de poros expandidos é a eletrofiação com lixiviação de sal. A técnica baseia-se na eletrofiação de uma solução polimérica contendo grãos de sal. Estes são lançados juntamente com as fibras que produzem o *scaffold*, ficando incorporados dentro da estrutura. Terminada a eletrofiação do *scaffold*, os grãos são dissolvidos criando espaços vazios no seu lugar. Este método permite algum controlo sobre o tamanho dos poros determinado pelo tamanho das partículas [5].

Na mesma linha de raciocínio a remoção de fibras de determinado polímero alvo num *scaffold*, mostra-se uma forma competente em promover a porosidade da matriz. Ana Guimarães *et al.* eletrofiaram simultaneamente (co-eletrofiação) uma solução de PCL e uma de PEO, um polímero solúvel em água. Após a dissolução do PEO obtiveram uma matriz de PCL com poros maiores do que a eletrofiação apenas da solução de PCL na mesma fração de volume [34]. Todavia, neste método é preciso ter em atenção à quantidade de polímero sacrificado, para prevenir deformações na estrutura após imersão em meios aquosos [5, 30].

IV. Variantes no processo da eletrofiação

Adotando o mesmo mecanismo de co-eletrofiação, a eletropulverização aliada à eletrofiação é também uma opção a abordar este problema. Esta permite a pulverização de determinado componente de interesse, seja uma solução polimérica, sejam células suspensas numa solução, realizada à medida que se produz o *scaffold* pela eletrofiação [30].

Numa maior simplicidade do procedimento experimental, estudos sugerem a combinação de fibras na ordem dos micrómetros e nanómetros. Enquanto que as nanofibras

se assemelham à MEC, auxiliando a adesão celular, as microfibras induzem aberturas na estrutura favorecendo a infiltração celular. Mesmo assim, as aberturas formadas pelas nanofibras continuam a inibir a migração das células por toda a estrutura [5, 25, 30].

V. Modificações pós-eletrofiação

Alguns métodos implicam somente modificações na estrutura após a eletrofiação. Por exemplo, a sonicação e a técnica de produção de esponjas. Os ultrassons emitidos pelo sonicador interagem com a matriz provocando a dispersão de fibras compactadas. Este tratamento físico afeta a densidade das fibras, o calibre do poro, a porosidade, e ainda a espessura do *scaffold*. Com um resultado semelhante, a produção de esponjas compreende a ação de um agente gasoso na matriz [25]. Patrick T.J *et al.* utilizaram partículas de bicarbonato de sódio. Aquando da imersão do *scaffold* numa solução de ácido cítrico, a reação entre os compostos provocou a formação de bolhas de gás com a libertação de CO₂. Este gás expandiu a estrutura, dando origem a uma rede de poros no *scaffold* [35]. Contudo, este fenómeno de expansão enfraquece as propriedades mecânicas do *scaffold*.

VI. Combinação de técnicas de produção de *scaffolds*

Segundo a literatura, autores reagem positivamente à combinação de estratégias, comparativamente à utilização das metodologias da eletrofiação por si só [30]. Mahdihyeh *et al.* juntaram a técnica de um componente sacrificado, como habitualmente o PEO, com a sonicação. As amostras que sofreram esta fusão mostraram-se alician-tes no tamanho de poros, e na manutenção da estabilidade mecânica [36]. Outros autores reportam ainda o sucesso da combinação da eletrofiação com outras técnicas de produção de *scaffolds*. Por exemplo, Xianyou Zheng *et al.* prepararam *scaffolds* por eletrofiação e liofilização com o objetivo de, conciliar o suporte estrutural fornecido pela eletrofiação, com os poros criados pela liofilização [37].

Combinações deste estilo são uma motivação ao aparecimento de inovações derivadas da eletrofiação, em criar *scaffolds* que permitam a infiltração celular.

Os métodos acima referidos constituem exemplos representativos dos estudos publicados. Na Tabela 2.1 encontram-se brevemente resumidas algumas das técnicas descritas. Desta forma, testemunha-se o modo como o avanço tecnológico provocou o desenvolvimento de estratégias associadas à configuração convencional da eletrofiação, na procura de superar esta limitação. Apesar de os progressos se mostrarem encorajadores, existem ainda vantagens associadas às técnicas que procuram assegurar poros e interconectividade adequados à infiltração das células. São pretendidas técnicas simples, eficazes, com resultados reproduzíveis, em escala e com as propriedades necessárias à regeneração dos tecidos [30]. Neste cenário, torna-se evidente o contínuo trabalho de investigação a ser feito à volta desta questão.

CAPÍTULO 2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

Tabela 2.1: Técnicas aplicadas na resolução do problema de matrizes com poros adequados à infiltração celular. (Imagens retiradas de [30]).

	Nome	Representação Esquemática	Descrição
II. Alterações na configuração experimental padrão	Eletrofiação com coletor em banho		Reservatório líquido usado para recolher as nanofibras de eletrofiação.
	Eletrofiação com coletor arrefecido		Deposição de fibras poliméricas e formação de partículas de gelo num coletor arrefecido.
III. Utilização de componentes sacrificados	Eletrofiação com lixiviação de sal		Partículas de sal incorporadas na eletrofiação de fibras e posterior remoção destas partículas por dissolução.
	Dissolução de fibras		Eletrofiação de fibras de PEO ou outro tipo de polímero solúvel e sua posterior dissolução (Ex: em água).
IV. Variantes no processo da eletrofiação	Eletropulverização		Eletrofiação e eletropulverização de um componente celular ou polimérico.
	Nanofibras e Microfibras		Combinação de eletrofiação de micro e nanofibras.
V. Modificações pós-eletrofiação	Sonicação		Aplicação de ultrassons sobre a matriz com resultante dispersão das fibras.
	Técnica de produção de esponja		Introdução de um agente gasoso na matriz com consequente formação de bolhas que criam poros pela libertação do gás (Ex. CO ₂).

2.4 Biomateriais

Os biomateriais constituem a base da construção dos *scaffolds*. Segundo a definição atual da *European Society for Biomaterials* (ESB), um biomaterial é descrito como “um material destinado a interagir com os sistemas biológicos, a fim de avaliar, tratar, melhorar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo”. Nos últimos anos, vários biomateriais têm sido processados com potencial para aplicações biomédicas, tais como metais, cerâmicos e polímeros [38]. Dentro destes, os polímeros são particularmente interessantes devido à relativa facilidade de produção aliada à flexibilidade em sintetizar uma vasta gama de estruturas (filmes, fibras, esponjas, ...), e às suas propriedades físicas e químicas, apropriadas a vários tecidos. Em comparação com os outros tipos de biomaterial, os polímeros oferecem uma maior versatilidade, tendo sido amplamente usados em Engenharia de Tecidos, nomeadamente em substitutos de tecidos moles, como é o caso da pele [6, 20, 39].

2.4.1 Polímeros

Os polímeros são macromoléculas constituídos por várias unidades estruturais repetitivas, os monómeros. Podem ser encontrados na natureza, provenientes de animais e plantas, ou podem ser produzidos artificialmente a partir de reações químicas. Enquanto que os polímeros naturais beneficiam de uma semelhança com a composição da MEC natural dos tecidos, proporcionando excelente interação com as células pelo reconhecimento biológico, os polímeros sintéticos possibilitam maior manipulação e controlo das suas propriedades físico-químicas, como a resistência mecânica e a taxa de degradação, tornando-se mais ajustáveis consoante a necessidade [10, 38]. Em suma, dada uma abordagem específica, cada um tem vantagens que os tornam mais aptos para determinado efeito, e desvantagens que os tornam limitativos noutros aspetos. Este contrabalanço tem levado ao interesse em conjugar polímeros de diferentes origens, na possibilidade de tirar maior proveito das características dos dois tipos no desempenho do *scaffold* [17, 40].

Alguns dos polímeros naturais mais comuns na eletrofiação são o colagénio, o quitosano e a gelatina. Quanto a polímeros sintéticos podem citar-se o ácido poliglicólico (PGA), polilático (PLA), poli(lático-co-glicólico) (PLGA), e a policaprolactona [6]. Relativamente à pele, a escolha do biomaterial incide principalmente no colagénio por se tratar do composto mais abundante da MEC do tecido. Porém, vários artigos mencionam a fraca estabilidade mecânica desta proteína como um grande problema da sua utilização [16, 17, 26]. Outros candidatos promissores no fabrico de *scaffolds* para o tratamento de feridas cutâneas são os polissacáridos. Dentro desta classe encontra-se o quitosano, um dos polímeros mais usados no tratamento da pele a seguir ao colagénio [17].

2.4.1.1 Policaprolactona

A policaprolactona ou poli(ϵ -caprolactona), é um poliéster alifático linear composto por unidades de hexanoato, e é sintetizada sobretudo pela polimerização por abertura do anel da ϵ -caprolactona (Figura 2.6) [41]. Caracteriza-se por ser um polímero semi-cristalino, hidrofóbico e biocompatível. É também conhecida por se degradar lentamente sob condições fisiológicas, dependendo do peso molecular e do grau de cristalinidade. O seu ponto de fusão situa-se entre os 59 °C e os 64 °C, e revela alta solubilidade em vários solventes orgânicos à temperatura ambiente [42]. Do ponto de vista da produção de *scaffolds*, a PCL apresenta propriedades reológicas e viscoelásticas que a tornam fácil de processar e manipular. Todas estas características têm incentivado a utilização deste polímero em detrimento dos outros polímeros sintéticos, tornando-o uma preferência na área biomédica, nomeadamente na Engenharia de Tecidos [43, 44].

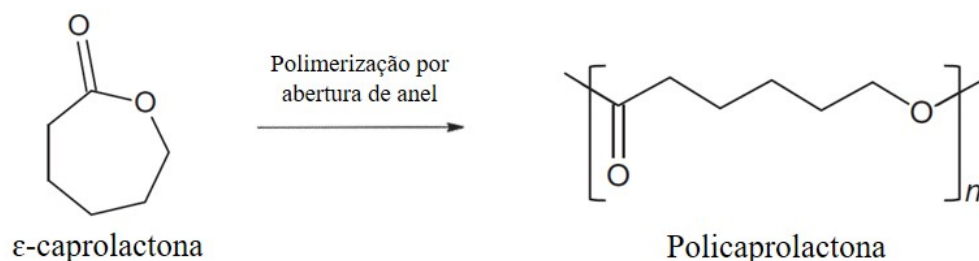


Figura 2.6: Esquema de polimerização da policaprolactona a partir da ϵ -caprolactona. Estruturas químicas do anel cíclico da ϵ -caprolactona e da unidade monomérica da policaprolactona. (Retirado de [41]).

A PCL é largamente utilizada em diversas aplicações médicas como em materiais de sutura, dispositivos de libertação controlada de fármacos e na regeneração de tecidos e órgãos, mais frequentemente de nervos, ossos, vasos sanguíneos e pele [43]. Além do mais, a afluência de artigos que adotam nanofibras de PCL evidencia como este biomaterial é bem-sucedido na eletrofiação de *scaffolds* [45]. Contudo, mediante a sua natureza hidrofóbica, a PCL depara-se com uma fraca afinidade com as células. Para melhorar as suas propriedades bioativas tem havido interesse em combinar a PCL com outros polímeros [44]. Por exemplo, Jayarama et.al, demonstraram melhorias na adesão, proliferação e migração de fibroblastos através de uma membrana de nanofibras de colagénio misturado com PCL. No que diz respeito à pele, este mesmo estudo revelou auxiliar a cicatrização normal de feridas [46].

2.4.1.2 Quitosano

O quitosano é um polissacárido derivado da quitina, o segundo polímero natural mais abundante. Embora o quitosano seja raramente encontrado no meio ambiente, pode ser produzido industrialmente a partir da quitina, um polissacárido proveniente essencialmente do exoesqueleto dos crustáceos (camarão, lagosta, caranguejo) e insetos, e ainda da

parede celular de fungos e de leveduras. A estrutura química destes polímeros consiste em ligações glicosídicas do tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$ entre as unidades N-acetil-glucosamina e as unidades glucosamina (Figura 2.7a). Através da desacetilação da quitina, remoção do grupo acetil ($-\text{COCH}_3$) e substituição por um hidrogénio ($-\text{H}$) originando a unidade glucosamina, obtém-se o quitosano (Figura 2.7b). Este processo pode dar-se por métodos enzimáticos ou, mais frequentemente, por tratamento alcalino, sendo o grau de desacetilação proporcional à quantidade de grupos amina ($-\text{NH}_2$) convertidos, isto é, ao número de glucosaminas. Apesar de não estar bem delineado, a distinção entre a quitina e o quitosano é dada pela proporção relativa das unidades monoméricas, N-acetil-glucosamina e glucosamina, presentes na estrutura. Em geral é considerado quitosano quando o número de glicosaminas ao longo da cadeia for no mínimo cerca de seis décimos do número total de unidades, ou seja, um grau de desacetilação superior a 60%. Contrariamente, trata-se de quitina quando o grau de desacetilação for inferior a 60% [47–49].

Como consequência das diferenças estruturais destes polímeros, as suas propriedades físico-químicas e biológicas também diferem. A existência dos grupos amina no quitosano atribui-lhe alta solubilidade em solventes ácidos. Já a quitina, na falta desses grupos, é insolúvel na maior parte dos solventes, tornando-se escassa a sua aplicabilidade [47].

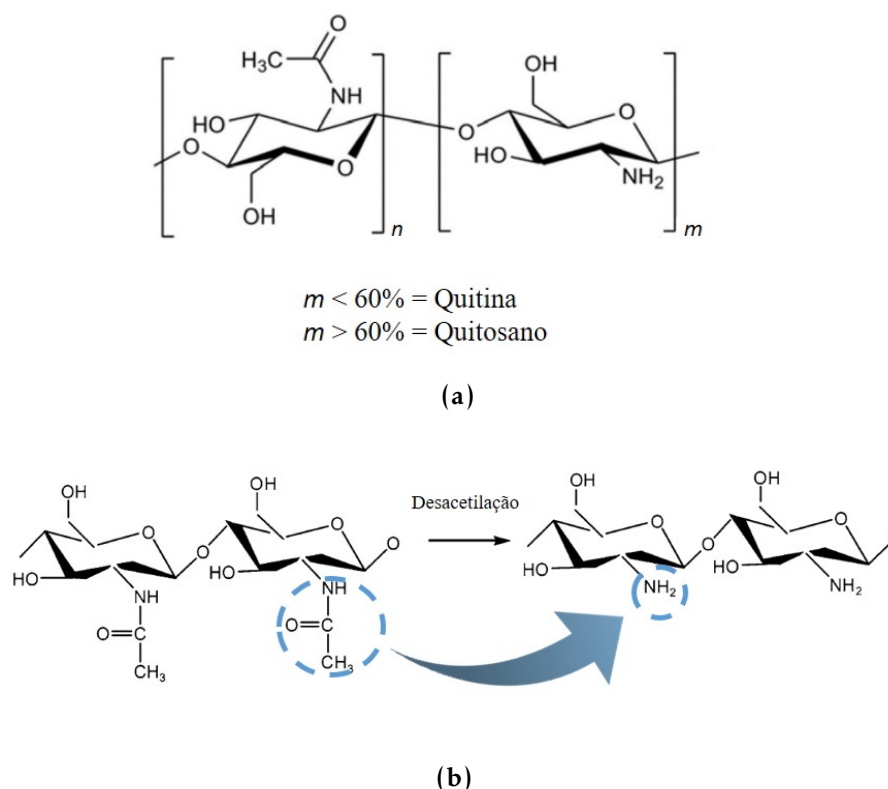


Figura 2.7: Composição e síntese do quitosano. (a) Estrutura química dos monómeros que compõem o quitosano e a quitina, onde a proporção de glucosaminas convertidas (m) dita de que copolímero se trata. (b) Desacetilação resultando na conversão das unidades N-acetil-glucosamina em unidades glucosamina. (Adaptado de [48].)

É frequentemente utilizado nos sistemas de libertação controlada de fármacos, em membranas de regeneração de tecidos e noutros dispositivos médicos [53]. Adicionalmente, este biomaterial tem sido uma opção recorrente na técnica de eletrofiação pela sua facilidade em produzir nanofibras viáveis, sendo deste modo considerado um polímero modelo, ao ponto de ser escolhido para a realização de um estudo sistemático de caracterização da técnica [57].

2.4.1.4 Combinação: Policaprolactona e Quitosano

Mediante as particularidades da PCL e do CS várias publicações têm vindo a demonstrar a viabilidade e o sucesso da utilização simultânea destes dois polímeros no fabrico de *scaffolds* usados na reconstrução de vários tecidos, entre os quais, fígado [58], pele [59], osso [60], cartilagem [61], vasos sanguíneos [62], e tecido nervoso [63]. É possível encontrar diferentes combinações, incluindo misturas [64], revestimentos [65], co-eletrofiação de fibras [66] e outras técnicas de produção de *scaffolds*, tais como as representadas na Figura 2.9.

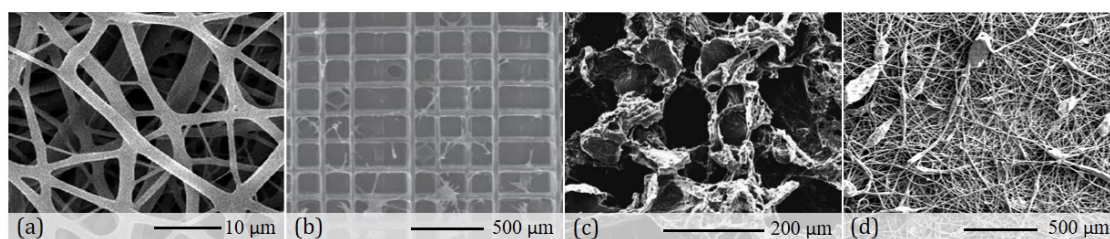


Figura 2.9: Imagens microscópicas da morfologia de alguns *scaffolds* resultantes da combinação PCL/CS, documentadas na literatura. (a) Eletrofiação de uma solução de PCL/CS [59]. (b) Impressão 3D de PCL/CS, por controlo computacional, com representação de fibroblastos semeados após 2 dias de cultura [67]. (c) Lixiviação de partículas de NaCl [68]. (d) Eletrofiação de partículas de CS dispersas na solução de PCL [69].

Tilak Prasad *et al.* [59] investigaram *scaffolds* de fibras de PCL e de PCL/CS (Figura 2.9a). Estes autores observaram que os *scaffolds* de PCL/CS apresentam uma diminuição da hidrofobicidade, e favoreceram a adesão e proliferação celular em comparação com *scaffolds* apenas de PCL. Identicamente, Yang Wu *et al.* [67] avaliaram PCL/CS por impressão 3D (Figura 2.9b), tendo observado uma densidade de células ligeiramente maior nos *scaffolds* híbridos relativamente aos *scaffolds* puros de PCL. Já Xiaobing Jiang *et al.* [68] puderam constatar melhorias na estabilidade mecânica dos *scaffolds* no estado hidratado, adicionando PCL na solução de CS (Figura 2.9c). Assim sendo, estas abordagens revelam que a junção do CS com a PCL permite compensar as restrições dos mesmos quando usados isoladamente, ao reunir as propriedades mecânicas e biológicas desejadas.

Ainda relativamente à utilização combinada destes biomateriais, outros autores dispersaram CS em forma de partículas numa solução de PCL, para a produção de membranas pela técnica de eletrofiação (Figura 2.9d). Microscopicamente observaram que a maioria das partículas ficavam envoltas em PCL [69], pelo que, dada a não exposição do CS, a manifestação das suas propriedades corre o risco de ficar comprometida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão abordados os procedimentos e equipamentos utilizados no objetivo de construir matrizes dotadas de características que conferem um ambiente propício ao alojamento das células em toda a sua dimensão.

O trabalho experimental compreende essencialmente o desenvolvimento das matrizes poliméricas com poros expandidos por co-eletrofiação, e subsequente caracterização física. Posteriormente realizaram-se ensaios *in vitro*, com a cultura de células sobre as matrizes produzidas e a avaliação da atividade celular nas mesmas.

3.1 Materiais e Soluções

Primeiramente foram preparadas soluções poliméricas para a produção das matrizes. Sendo a co-deposição por eletrofiação o processo adotado, foram usadas separadamente duas variedades de soluções: uma de PCL, e uma de micropartículas de CS dispersas em PEO. A solução de PCL servirá para produzir a estrutura fibrosa da matriz, e a solução de PEO e CS é propositada à expansão de poros. O PEO não só permite a deposição do CS, como também contribui para as propriedades porosas da matriz, após a sua dissolução em meio aquoso.

Dos materiais utilizados, a PCL (massa molecular $M_n = 70-90$ kg/mol) e o PEO (massa molecular $M_n = 900$ kg/mol) foram adquiridos à Sigma-Aldrich, e o CS (massa molecular $M_n = 500$ kg/mol) à Cognis, com um grau de desacetilação de 75%. Os solventes, ácido acético glacial (AA) e etanol absoluto, foram fornecidos pela Scharlau e Panreac, respetivamente. À parte do CS, os restantes materiais foram usados tal como recebidos pelo fabricante.

3.1.1 Preparação das Soluções

Começou-se por preparar a solução de PCL e a solução de PEO (Tabela 3.1). De forma a estudar o efeito dos grãos de CS na matriz, utilizaram-se diferentes gamas de granulometrias e diferentes proporções de polímeros PCL e CS na composição da matriz. Para tal foram preparadas várias combinações de CS na solução de PEO previamente produzida (Tabela 3.2). Nestas condições perfaz-se um total de nove soluções distintas preparadas, uma de PCL e oito de PEO+CS. As concentrações das soluções referem-se à razão entre a massa de polímero relativamente à massa total da solução, representadas em percentagem mássica (m/m).

Tabela 3.1: Composição das soluções PCL e PEO.

Soluto	Concentração (% soluto)	Solvente	Concentração (% solvente)
PCL	20	Ácido acético glacial	80
PEO	4,2	Água destilada	32,5
		Etanol absoluto	63,3

Tabela 3.2: Composição das soluções de PEO+CS.

Designação	Concentração (% soluto)	Granulometria (μm grãos)	Proporção Relativa
	CS	CS	PCL:CS
PEO+CS200-150	4	200-150	1:1
PEO+CS150-100		150-100	
PEO+CS100-50		100-50	
PEO+CS50-0		50-0	
PEO+CS1:0,5	4	200-50	1:0,5
PEO+CS1:1	4		1:1
PEO+CS1:2	6		1:2
PEO+CS1:3	8		1:3

*A coluna da “Proporção Relativa” está relacionada com a fração de massa de PCL e CS na matriz eletrofiada.

No princípio, as soluções, tanto de PCL como de PEO+CS, foram preparadas em clorofórmio, mas alguns aspetos levaram a trocar de solvente. Mais tarde, com os solventes mencionados anteriormente, conseguiram-se produzir fibras de PCL com diâmetros mais próximos à rede da MEC nativa, e fibras de PEO mais aptas no transporte e deposição dos grãos de CS.

Solução de PCL

A solução de PCL a 20% foi dissolvida em AA. A mistura foi deixada no agitador magnético até ao dia seguinte, sendo posteriormente submetida a um banho de ultrasons durante 30 minutos, para garantir a dissolução total do polímero. Esta solução foi utilizada num período de 24 h após a sua preparação.

Solução de PEO+CS

Para a solução de PEO+CS, primeiro o PEO foi dissolvido num solvente composto por 66% de etanol absoluto e 34% de água destilada. Esta mistura permaneceu sob agitação magnética até à dissolução completa do polímero, e só depois é que os grãos de CS foram adicionados.

Consideraram-se quatro intervalos granulométricos: [200-150], [150-100], [100-50] e [50-0] μm ; e diferentes concentrações de CS na solução de PEO, a fim de se estabelecer várias razões mássicas de PCL em relação ao CS: 1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:3. Sabendo o caudal usado no processo de eletrofiação, o tempo decorrido e a densidade da solução, é possível conhecer a quantidade de polímero eletrofiado. Deste modo foi necessário determinar a densidade das soluções, para saber precisamente as concentrações de CS a preparar. Este cálculo permite assim prever a proporção de polímero pelo qual a matriz é composta.

i) Produção de grãos de CS:

O CS proveniente diretamente do fornecedor encontra-se na forma de grãos com dimensões maioritariamente variáveis entre os 300 e os 500 μm . Como tal, foram moídos por um moinho de café, MO 3300 da Orbegozo (Figura 3.1a). Posteriormente os grãos foram recolhidos e separados nas diferentes peneiras, com os respetivos diâmetros pretendidos (Figura 3.1b), através de um agitador de peneiras, AS 300 control da Retsch, (Figura 3.1c). Este sistema produz vibração com uma amplitude de 1,2 mm, fazendo com que o material atravessasse as peneiras empilhadas e seja distribuído de forma automatizada e rápida.



Figura 3.1: Imagens dos modelos dos equipamentos usados na obtenção dos grãos de CS nas diferentes granulometrias. (a) Moinho de café. (b) Peneiras. (c) Agitador de peneiras.

Apesar de o moinho permitir a redução de tamanho dos grãos, tornou-se difícil uma aquisição em quantidade suficiente para a fase de testes e posterior produção de matrizes. Perante esta dificuldade procuraram-se alternativas na obtenção de grãos em abundância nas devidas granulometrias. Como tal, foi adotada a eletropulverização (*electrospray*), uma variante da eletrofiação, para a produção de micropartículas de CS. Estas técnicas partilham dos mesmos equipamentos, sendo que no *electrospray* a solução é pulverizada,

formando pequenas gotas em vez da fiação convencional de fibras. Este fenómeno deve-se à quebra do jato provocado pela baixa viscosidade da solução [70]. O CS foi dissolvido em AA e água destilada, e gotejado em direção a um coletor em banho de Hidróxido de Sódio (NaOH). O AA reage com NaOH e o polímero precipita, dando origem a micropartículas de CS. Porém, os tamanhos inadequados e a ineficiência e dificuldade em controlar o processo levou ao abandono desta via. No anexo I encontra-se um breve resumo do procedimento e resultados obtidos para os primeiros ensaios realizados.

ii) Determinação da densidade:

A densidade de cada solução foi determinada usando um picnómetro com 1 ml de volume. Primeiro o picnómetro foi pesado vazio. Em seguida, um dado volume de solução foi transferido para o picnómetro, sendo novamente pesado. Recorrendo à expressão matemática (3.1) foi calculada a densidade. As medições foram realizadas em triplicado à temperatura ambiente.

$$\rho = \frac{massa_{c/solução} - massa_{vazio}}{volume_{1ml}} \quad (3.1)$$

A escolha dos biomateriais recai na suas características benéficas e na sua disponibilidade e acessibilidade de recursos. Relativamente às soluções, a de PCL foi definida com base nos resultados experimentais descritos por J. Ferreria *et al.* [71], e a de PEO baseada no trabalho de C. Henriques *et al.* [57]. Ambas sofreram as alterações necessárias à otimização do processo. O aspeto das soluções preparadas é mostrado na figura seguinte.



(a) Solução de PCL antes dos ultrassons. (b) Solução de PCL depois dos ultrassons. (c) Solução de PEO. (d) Solução de PEO com grãos de CS dispersos.

Figura 3.2: Aparência das soluções poliméricas preparadas para a produção das matrizes. Observa-se: (a), (b) solução de PCL torna-se completamente transparente após o banho de ultrassons; (c), (d) solução de PEO torna-se mais opaca aquando da adição de grãos de CS.

3.2 Métodos de Produção das Matrizes

Seguiu-se a produção das matrizes pelo processo de eletrofiação. Numa mesma montagem foram depositadas simultaneamente duas soluções poliméricas, uma de PCL e uma de PEO+CS. Recorrendo a este sistema obtém-se uma matriz com fibras de PCL intercaladas com fibras de PEO e grãos de CS.

As matrizes produzidas terão uma nomenclatura idêntica à das soluções de PEO+CS. Os primeiros índices, em vez de “PEO+CS(…)” passam a designar-se “PCL+PEO+CS(…)”. Numa etapa futura de esterilização e lavagem das matrizes, estas terão as fibras de PEO removidas, pelo que a ausência desta abreviatura mais adiante traduz este processo.

Os parâmetros usados na fiação das soluções começaram por seguir os parâmetros de referência dos respetivos artigos mencionados anteriormente. Estes foram reajustados, de modo a permitir a deposição dos grãos de CS pelas fibras de PEO, simultaneamente à deposição de fibras de PCL. Para isso, foi realizada uma análise sistemática da influência dos parâmetros do caudal, da distância e da tensão de cada solução, individualmente. Os valores usados na técnica de eletrofiação otimizada para cada solução encontram-se na Tabela 3.3.

A humidade relativa e a temperatura rondaram os 50 a 60 % e 20 a 24 °C, respetivamente. Todas as deposições decorreram durante quatro horas contínuas, visto ser o tempo suficiente para se obter uma espessura de membrana suficientemente resistente para a sementeira de células.

Tabela 3.3: Parâmetros de co-eletrofiação usados nas soluções para a produção das várias matrizes.

Soluções	Tensão (kV)	Caudal (ml.h⁻¹)	Distância (cm)
PCL	10	0,3	23
PEO+CS200-150	15	2	33
PEO+CS150-100			
PEO+CS100-50			
PEO+CS50-0			
PEO+CS1:0,5	15	0,87	33
PEO+CS1:1		1,73	
PEO+CS1:2		2,28	
PEO+CS1:3		2,52	

3.2.1 Montagem Experimental

Conforme ilustrado na Figura 3.3a, a montagem experimental inclui dois processos de eletrofiação. Inicialmente ambas as deposições foram realizadas na horizontal em sentidos opostos. Todavia a perda de grãos no trajeto da solução de PEO+CS até ao coletor levou a abortar esta posição. Nesta condição, passou-se para uma orientação vertical, sendo adotado um sistema de co-eletrofiação perpendicular entre si.

As deposições foram realizadas dentro de uma câmara isoladora e o material foi usado em duplicado, duas bombas de infusão, duas fontes de tensão e duas seringas, com um coletor comum. Para uma distribuição uniforme de ambas as soluções usou-se um coletor cilíndrico de diâmetro 10 cm, e de frequência 2,5-3 rot/min em torno do seu eixo (Figura 3.3b).

As soluções foram introduzidas nas respectivas seringas e o coletor foi coberto com papel de alumínio, sendo este material usado como suporte da matriz.

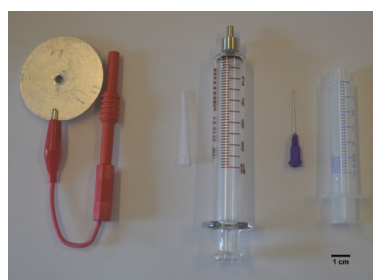
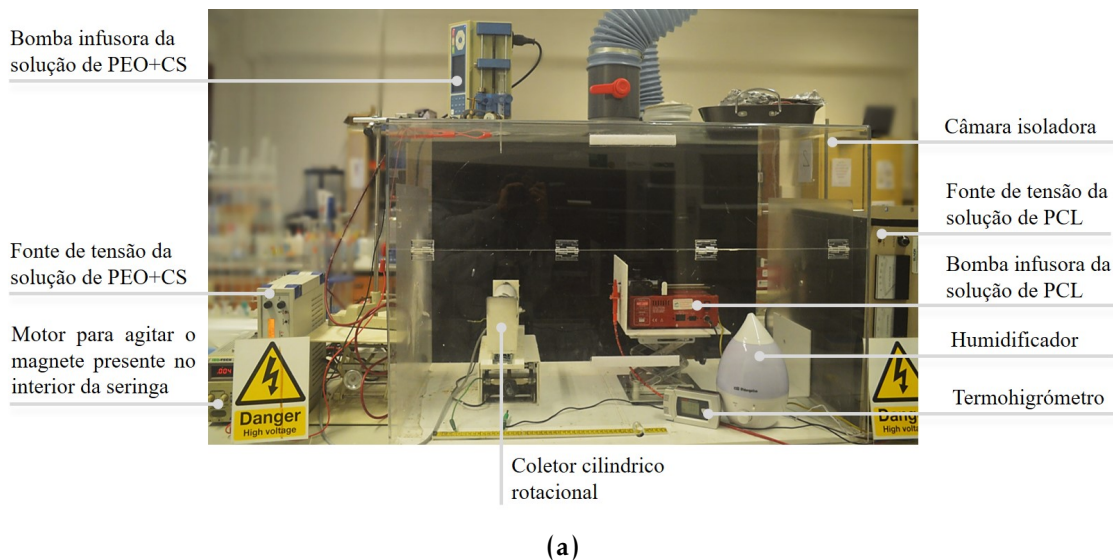


Figura 3.3: Materiais, equipamentos e configuração experimental adotados no processo de co-eletrofição para a produção das matrizes. (a) Montagem de co-eletrofição. (b) Coletor cilíndrico rotacional. (c) Chapa metálica, ponta de pipeta e seringa de vidro para a solução de PEO+CS, agulha hipodérmica e seringa de plástico para a solução de PCL.

A solução de PCL foi eletrofiada a partir de uma seringa NORM-JECT de plástico de 5 ml, com uma agulha de calibre 21G. A deposição das fibras de PCL foi orientada na horizontal enquanto que a das fibras de PEO com os grãos de CS posicionou-se na vertical. Nesta solução usou-se uma seringa RUTHE de vidro de 10 ml, com uma ponta de pipeta adaptada à extremidade metálica da seringa (Figura 3.3c). A ponta de pipeta apresenta uma geometria em cone que previne a acumulação dos grãos no interior do capilar. Entre a extremidade da seringa e a ponta de pipeta usou-se ainda um disco de alumínio, onde foi aplicada a tensão. Este tem como objetivo não só polarizar a solução, visto que a ponta de plástico não permite o contacto elétrico, como aumentar a convergência das fibras de PEO e dos grãos de CS em direção ao coletor. Uma vez que os grãos continuaram a entupir a sua passagem, foi colocado um magnete no interior da seringa, mantendo-se em agitação através de um motor, a fim de evitar a sedimentação dos grãos quando a solução se encontra em repouso.

3.3 Métodos de Caracterização das Matrizes

A caracterização física das membranas permite aferir de que forma a introdução dos grãos influencia as suas propriedades estruturais, morfológicas, mecânicas, porosas e a permeabilidade ao vapor de água.

3.3.1 Análise Morfológica

De modo a averiguar a microestrutura das matrizes, estas foram analisadas quanto à sua morfologia por meio da microscopia ótica e eletrônica. Estas ferramentas tornaram-se úteis no ajuste dos parâmetros do processo de eletrofiação, a fim de otimizar as condições de produção das membranas, e na avaliação topográfica da sua superfície, nomeadamente quanto à disposição dos grãos, uniformidade e diâmetros das fibras.

Os microscópios óticos utilizados possibilitaram uma visão geral das estruturas produzidas (Figura 3.4a e 3.4b). A partir destes foi possível observar a superfície das membranas, conseguindo-se ainda uma observação ampliada das fibras e dos grãos eletrofiados.

Para uma visualização mais detalhada recorreu-se ao Microscópio Eletrónico de Varri-mento (MEV), que deu acesso a imagens de elevada resolução (Figura 3.4c). Este equipa-mento tem como princípio a formação de imagem através da incidência de um feixe de elétrões. As amostras foram coladas num disco de alumínio com fita de carbono. Dada a sua natureza polimérica, as amostras foram revestidas por um metal, o irídio (Ir). As imagens recolhidas foram processadas no programa ImageJ para a determinação dos diâmetros das fibras.

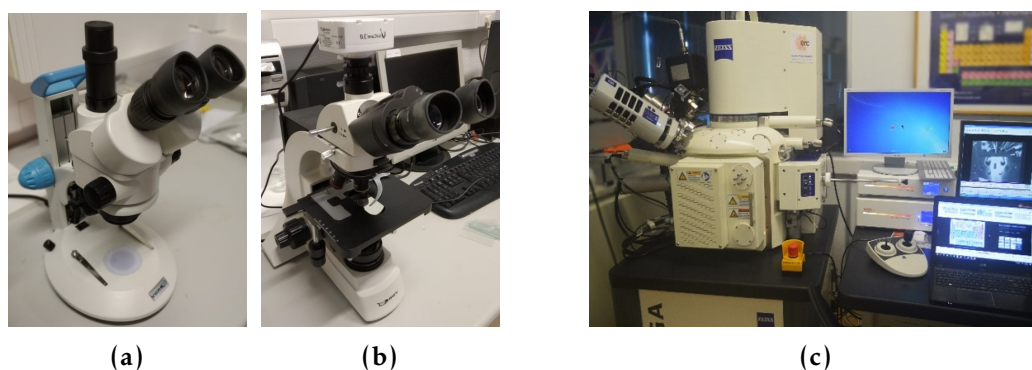


Figura 3.4: Microscópios usados na caracterização morfológica das membranas. (a) Microscópio estereoscópico; (b) Microscópio ótico VWR VisiScope®, acoplado a uma câmara Visicam 3.0; e (c) Microscópio eletrónico de varrimento modelo Zeiss DSM-96, existente nas instalações do CENIMAT/I3N.

3.3.2 Ensaios de Tração

A caracterização mecânica permite avaliar o comportamento dos *scaffolds* quando solicitados a forças externas. Tendo em atenção que os *scaffolds* devem ser capazes de suportar o manuseamento, adaptar-se aos contornos anatómicos, não sofrer deformações

permanentes após aplicação, e assegurar a sustentabilidade e estabilidade das células, o estudo das suas propriedades mecânicas é importante [20].

As propriedades mecânicas foram analisadas com base em testes de tração. O ensaio de tração determina o perfil de deformação de um corpo sob a aplicação de uma força de tração gradualmente crescente. A amostra é alongada a uma taxa constante até à sua rutura. Ao longo do ensaio são registados os valores da variação do comprimento e respetiva carga exercida sobre o material. No final obtém-se a relação tensão vs. deformação, a partir da qual é traçado um gráfico (Figura 3.5). A curva de tração fornece várias componentes mecânicas de interesse, como a resistência à tração, o módulo de elasticidade, e a tensão e deformação à rutura [72].

Apesar de a pele não ser puramente elástica, o módulo de Young dá uma aproximação da resistência mecânica do tecido [73].

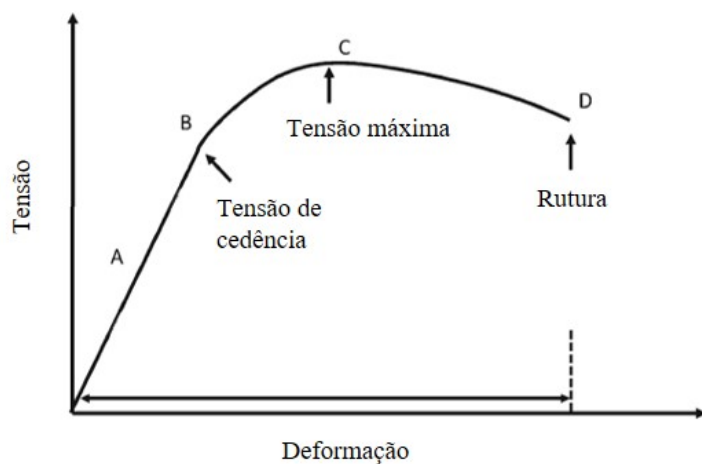


Figura 3.5: Curva típica de um polímero submetido ao ensaio de tração. A resposta do material à tração inicia-se com a fase elástica (A), que termina na tensão de cedência (B). Com a aplicação contínua da força, atinge-se a tensão máxima que o material suporta sem se romper (C). O ensaio acaba quando se dá a quebra total do material (D). (Adaptado de [74]).

O módulo de elasticidade ou módulo de Young, E , é uma medida da capacidade do material resistir à deformação elástica. Relaciona-se com a tensão aplicada no material (σ , N/m^2 ou Pa), e com a deformação sofrida por este (ϵ , medida adimensional). É obtida pelo declive da reta na zona inicial da curva de tração, que corresponde à região elástica definida pela Lei de Hooke (Equação (3.2)) [75].

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad (3.2)$$

A tensão é definida pela razão entre a força aplicada (F) e a área de secção transversal inicial da amostra (A), (Equação (3.3)). A deformação é determinada através do quociente entre o alongamento sofrido pelo material (Δl) e o comprimento inicial (l_0), (Equação (3.4)) [75].

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (3.3)$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (3.4)$$

As amostras foram tracionadas sob condições ambientais, numa máquina da Rheometric Scientific (Figura 3.6). Esta foi programada para operar com uma célula de carga de 20 N e uma velocidade de tração de 2 mm.min⁻¹. Para cada matriz realizaram-se dez ensaios de tração, tendo sido recortadas amostras de diferentes deposições, com cerca de 1 cm de largura e 3 cm de comprimento. Para os cálculos das tensões e deformações foi necessário determinar o afastamento inicial entre as garras e a espessura das amostras, recorrendo a uma craveira e a um micrómetro, respetivamente. De frisar que a estimativa da espessura teve em conta medidas de três zonas distintas.

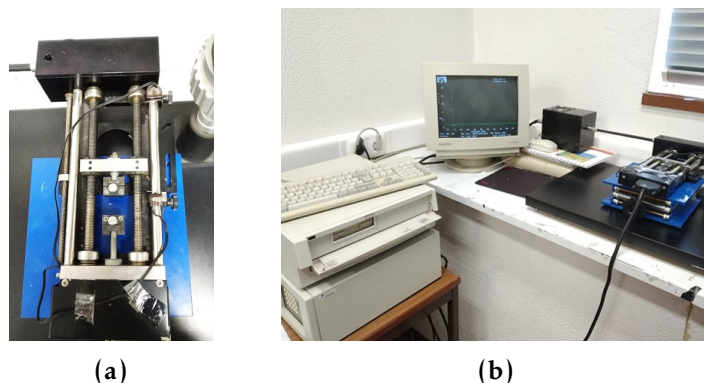


Figura 3.6: Equipamento usado na caracterização mecânica das membranas. Máquina de tração (a), aco-
plada a um computador com o software Minimat Firmware 3.1 (b), utilizado na aquisição dos dados.

3.3.3 Ângulo de Contacto

A determinação do ângulo de contacto é usada para caracterizar a hidrofili-
cidade do material. Foi demonstrado que este parâmetro influencia a resposta biológica, me-
lhorando a adesão e proliferação das células [76]. Posto isto, procedeu-se à medição do
ângulo de contacto pelo método da gota sêssil, efetuado com o equipamento OCA 20 da
DataPhysics Instruments GmbH (Figura 3.7).

O procedimento experimental consiste em colocar uma gota de água destilada de
5 µl, doseada com uma seringa, sobre a superfície da membrana. Através de uma câmara
de vídeo integrada no equipamento foram capturadas imagens da deposição da gota. A
partir destas, o software SCA20 analisou o perfil da gota, aplicando uma curva ajustada à
equação Young-Laplace, e calculou automaticamente o ângulo de contacto. Este ângulo
corresponde ao ângulo formado entre a superfície da membrana e a tangente à gota. Para
valores superiores a 90° o ângulo medido expressa a natureza hidrofóbica da superfície
(Figura 3.8a), sendo esta hidrofílica para valores inferiores a 90° (Figura 3.8b) [77, 78].



Figura 3.7: Equipamento e software utilizados na caracterização da hidrofiliicidade das membranas. Sistema ótico para a medição dos ângulos de contacto, utilizando o equipamento OCA 20 da DataPhysics Instruments GmbH, e o software SCA20.

Para a realização deste ensaio utilizaram-se amostras de cada uma das nove membranas diferentes. No entanto, este ensaio não teve apenas a finalidade de aferir a hidrofiliicidade das membranas. Recorreu-se também, para determinar o ângulo de contacto necessário ao cálculo do tamanho de poro das membranas. Tendo em conta as especificações do método de caracterização do poro, o ângulo de contacto foi medido com uma gota do líquido usado neste mesmo método. As amostras para este ensaio, foram preparadas a partir da fusão dos grânulos de PCL numa estufa a 60 °C, formando um filme. A produção deste filme visa assegurar uma superfície plana e homogénea, uma vez que o ângulo de contacto depende da rugosidade superficial e da porosidade da membrana [79]. Desta forma, espera-se obter valores mais realistas no que diz respeito à interação do líquido, usado no método de determinação do tamanho de poro, com as fibras.

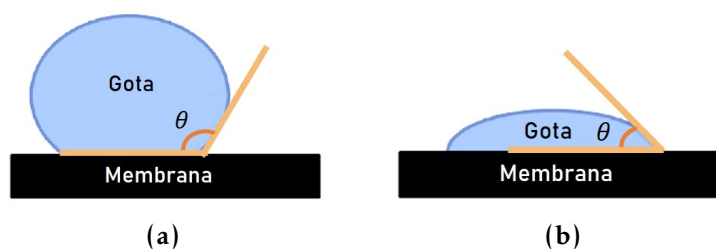


Figura 3.8: Representação esquemática da formação do ângulo de contacto, θ . (a) Gota formada numa superfície hidrofóbica, $\theta > 90^\circ$; (b) Gota formada numa superfície hidrofílica, $\theta < 90^\circ$. (Adaptado de [78]).

3.3.4 Tamanho Médio de Poro

A dimensão de um poro bem como toda a rede de poros, condicionam o movimento das células pela estrutura, pelo que a interconectividade entre poros e o tamanho de poro devem ser adequados à passagem das células para o interior da membrana. A determinação deste parâmetro permite indicar o modo como os grãos de CS são eficientes no aumento do calibre de poros na matriz.

O tamanho de poro e a sua distribuição podem ser calculados tradicionalmente por métodos baseados nos princípios de capilaridade e pressões controladas. Correntemente, das técnicas melhor estabelecidas nesta caracterização encontram-se a porosimetria por infiltração de mercúrio e o ponto de bolha (*bubble point*) [25, 80]. A infiltração de mercúrio tem como desvantagem a tendência em deformar amostras flexíveis, como é o caso das membranas de fibras, devido à aplicação de pressões elevadas, e a toxicidade do mercúrio [81]. Equacionando estes aspetos, o método do ponto de bolha torna-se mais indicado para esta análise.

O ponto de bolha relaciona-se com a pressão que é necessário exercer para que haja passagem de ar, através de uma amostra porosa embebida numa solução líquida. O aumento da pressão impulsiona gradualmente o líquido até que a determinada altura o caminho é totalmente aberto, surgindo bolhas à superfície (comportamento ilustrado nas imagens da Figura 3.9). O primeiro borbulhar corresponde ao poro de maior diâmetro. O contínuo aumento da pressão leva à abertura de poro após poro. As medidas sucessivas das variações do caudal de ar em função da pressão permitem quantificar de forma aproximada qual o tamanho médio de poro e o número de poros de cada tamanho [82, 83].

O tamanho de poro pode ser determinado a partir da equação de Washburn (3.5), onde D é o diâmetro de poro, γ é a tensão superficial do líquido, θ o ângulo de contacto do líquido com a membrana, e ΔP a diferença de pressão.

$$D = \frac{4\gamma \cos\theta}{\Delta P} \quad (3.5)$$

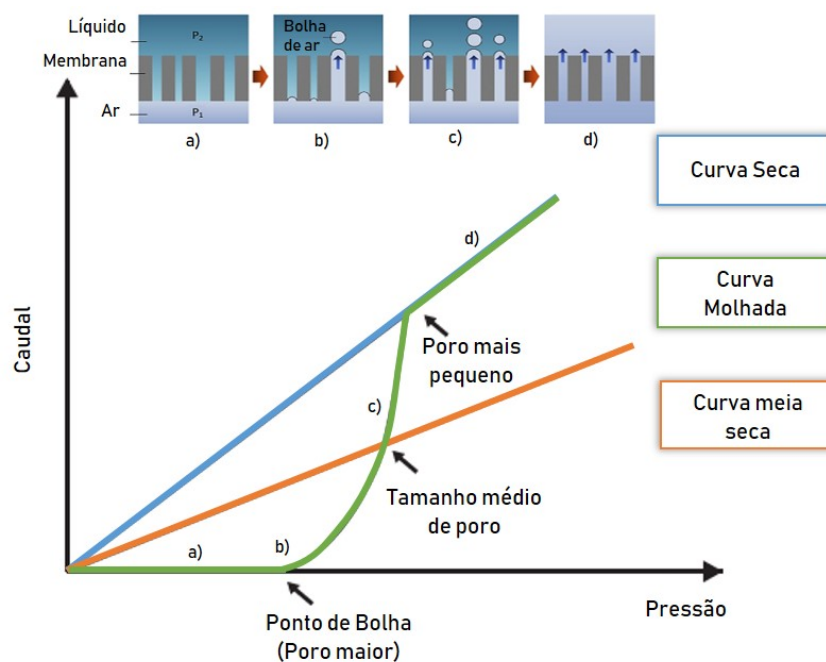


Figura 3.9: Gráfico obtido na caracterização do tamanho de poro, pelo método do ponto de bolha, e imagens ilustrativas do fenómeno. As imagens mostram o ar a atravessar a membrana embebida, à medida que é aplicada uma maior pressão. (Adaptado de [83, 84]).

Experimentalmente o ensaio é realizado duas vezes, uma vez com a amostra no estado seco e uma outra vez com a amostra embebida no líquido. Para cada ensaio é traçada a respetiva curva, a curva seca e a curva molhada, tal como representado no gráfico da Figura 3.9. Uma terceira curva é obtida, a curva meia seca, dividindo os valores de caudal da curva seca por dois. Esta curva permite determinar o tamanho médio de poro, através do ponto de interseção da mesma com a curva molhada.

Para a realização destes ensaios foi implementado um sistema de montagem, com base nas especificações do modelo iPore™ da Porous Materials, Inc. [84]. O sistema experimental usado inclui:

- uma fonte de ar comprimido a 5 Bar;
- uma válvula, SS-4MG da Swagelok, para controlar manualmente o fluxo de ar;
- um sensor de fluxo de ar, AWM5101 da Honeywell, alimentado por uma fonte de tensão DC a 10 V, sendo as leituras de caudal obtidas a partir de um multímetro;
- um barómetro, E28D da MKS, para medir a pressão no interior do sistema;
- uma peça base de suporte para se colocar a amostra, vedada com ligação do tipo KF.

O desenho esquemático e a montagem experimental apresentam-se na Figura 3.10a e 3.10b, respetivamente. A peça base e os restantes componentes de suporte, usados para assegurar a não deformação da amostra, encontram-se na Figura 3.10c. O anexo II contém o desenho técnico desta peça obtido através do SolidWorks.

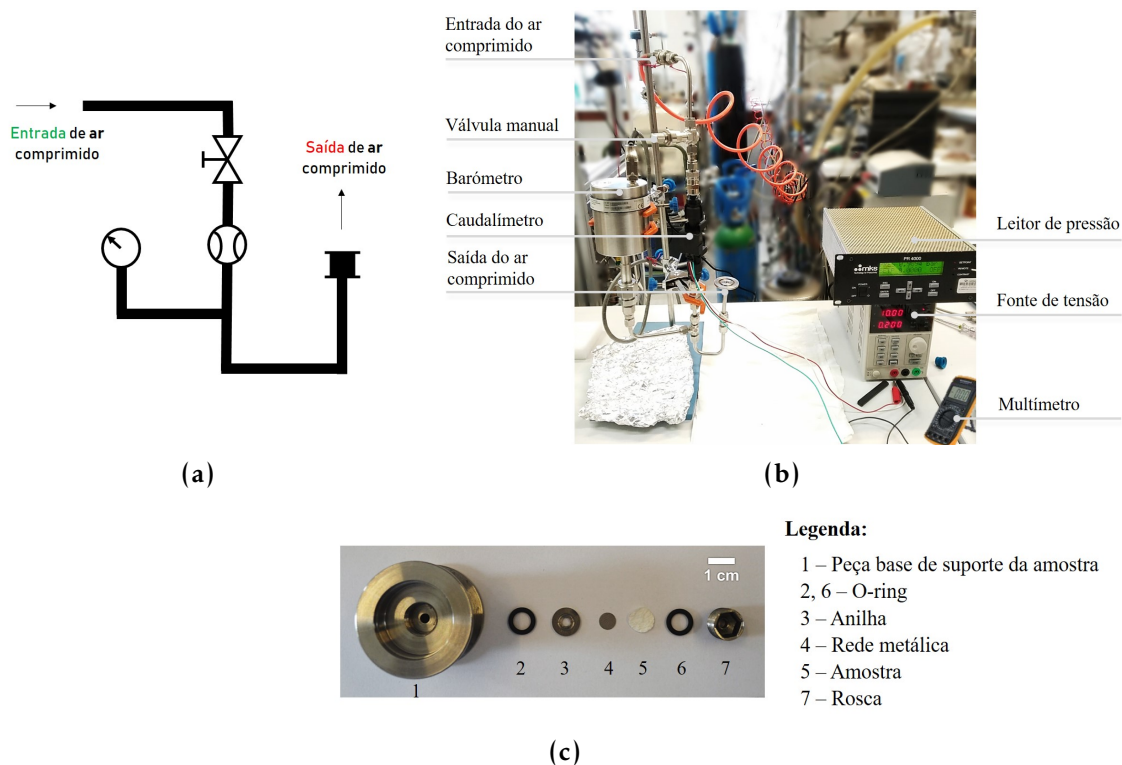


Figura 3.10: Imagens do esquema, da montagem e das peças de suporte usadas para a implementação do sistema de caracterização do tamanho médio de poro, pelo método do Ponto de Bolha. (a) Esquema da montagem; (b) montagem experimental; e, (c) peças de suporte mecânico e de vedação, montadas seguindo a sequência da imagem.

Para se proceder às medições de porosimetria as membranas foram cortadas com 10 mm de diâmetro. Conhecendo a natureza hidrofóbica da PCL, e tendo em conta que o líquido ao atravessar a amostra embebida interage maioritariamente com as fibras de PCL, quer seja numa membrana de PCL, quer seja numa de PCL+PEO+CS, para este ensaio é pretendido um solvente que “molhe” bem a amostra. Desta forma, optou-se por uma mistura de água e etanol. De modo a evitar a taxa de evaporação deste, foi descoberta a concentração mínima necessária para molhar a amostra, o que correspondeu a 10% de etanol.

A fim de validar a fiabilidade do sistema implementado, primeiramente foram testadas amostras de membranas de filtros, cujo tamanho de poro está registado pelo fornecedor. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente.

3.3.5 Permeabilidade ao Vapor de Água

Uma das funções essenciais na cicatrização de feridas é o controlo da perda de água. A propriedade de barreira da pele ao vapor de água permite evitar a humidade excessiva e a desidratação. Neste panorama torna-se importante analisar a permeabilidade das membranas ao vapor de água [85].

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada pela medição da taxa de transmissão de vapor de água (WVTR), através das membranas. Este parâmetro foi calculado gravimetricamente, de acordo com a norma ASTM E96-95 [86]. Posto isto, as membranas foram fixas com parafilm sobre a abertura de frascos de vidro (aproximadamente 46 mm de diâmetro) com 1/3 de água destilada (Figura 3.11). De seguida os frascos foram colocados num exsiccador contendo sílica-gel, e este por sua vez foi colocado numa estufa a 37 °C. Os frascos foram pesados em intervalos de tempo de hora a hora durante 10 h. A partir deste registo é traçado um gráfico de perda de massa vs tempo. Sobre a reta obtida é feita uma regressão linear, de onde se extrai o declive para o cálculo do WVTR.



Figura 3.11: Frascos de vidro cobertos pelas membranas produzidas por co-eletrofiação. Imagem ilustrativa das amostras preparadas para a realização dos ensaios da permeabilidade ao vapor de água.

Com esta metodologia as membranas são submetidas a uma humidade relativa dentro dos frascos de 100% para 0% fora destes. Enquanto que a água mantém um ambiente saturado no interior dos frascos, a sílica-gel seca o meio exterior. A temperatura controlada de 37 °C visa replicar a condição fisiológica da pele.

Os ensaios foram realizados em quadruplicado, e o WVTR foi calculado através da equação:

$$WVTR = \frac{m}{t} \times \frac{1}{A} \quad (3.6)$$

Onde m corresponde à massa de água absorvida pelo sistema, t ao tempo de incubação, e A à área de superfície da membrana exposta. Este parâmetro permite assim caracterizar o ritmo a que o vapor de água atravessa as membranas [86]. O controlo deste ensaio foi realizado num frasco contendo apenas água.

3.4 Testes *In Vitro*

Os testes *in vitro* destinam-se a avaliar a resposta das células às matrizes produzidas. O objetivo destes testes prende-se em analisar a adesão, proliferação, e o potencial infiltrativo das células usando as membranas como substrato. As células usadas são fibroblastos de pele humana, o principal componente celular na síntese e remodelação da matriz extracelular da camada dérmica da pele [10].

3.4.1 Cultura Celular: HFFF2

A cultura de células engloba um conjunto de procedimentos e condições que permitem isolar células do organismo, preservá-las ou expandi-las. O objetivo é proporcionar um ambiente artificial (*in vitro*) apropriado ao crescimento celular, permitindo realizar várias experiências e daí estudar vários parâmetros de interesse, como a expressão de genes, a citotoxicidade dos materiais, etc. Todo este processo é realizado em salas específicas, com equipamento de proteção e protocolos rigorosos, de modo a criar um ambiente estéril para efetuar culturas celulares livres de contaminações [87–89].

Para as culturas deste trabalho foram usadas linhas celulares HFFF2 (*Human Caucasian foetal foreskin fibroblast*), fibroblastos derivados da derme de um feto humano. Estas células dependem da ligação a um substrato, caracterizando-se como aderentes, podem efetuar um número finito de divisões, e apresentam uma morfologia alongada e fusiforme (Figura 3.12). Como ponto de partida, foram usados fibroblastos de embriões de ratos, da linhagem imortal NIH-3T3. Estas células possuem dimensões menores, e proliferam mais aceleradamente quando comparadas com as HFFF2, disponibilizando assim, resultados mais rápidos. Todavia, a sua utilização foi descartada pela inconsistência nos resultados da viabilidade celular, devido a picos de proliferação a meio da cultura.

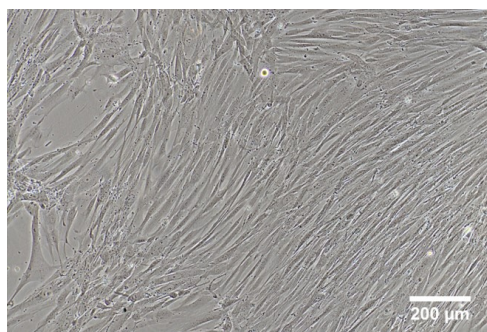


Figura 3.12: Imagem microscópica de fibroblastos da linha celular HFFF2, aderidos à superfície de um frasco de cultura. As HFFF2 crescem paralelamente entre si e exibem uma forma fusiforme no seu fenótipo natural. (Ampliação 100x).

As células HFFF2 foram adquiridas à ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*), e cultivadas em frascos de cultura com meio nutritivo. O meio usado foi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), com a adição de 1% de GlutaMAX™, 1% de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino (FBS, *Foetal Bovine Serum*), suplementado ainda com antibióticos, estreptomicina e penicilina, com uma fonte de energia D-glucose, e com bicarbonato de sódio. A cultura foi mantida numa incubadora a 37 °C, com uma atmosfera humidificada e CO₂ a 5%.

Quando a cultura atingiu cerca de 80% da confluência, ou seja, quando toda a superfície do frasco ficou praticamente coberta por células, estas foram semeadas sobre as membranas. Para as membranas serem usadas como substrato foram previamente recortadas amostras circulares com 12 mm de diâmetro (Figura 3.13a), sendo posteriormente esterilizadas com etanol 70%, lavadas duas vezes com uma solução tampão fosfato (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) e embebidas em DMEM completo durante 24 h. De seguida as membranas foram montadas em suportes cilíndricos de teflon, e colocadas em placas estéreis de 24 poços (Figura 3.13b). Estas estruturas de teflon permitem restringir a infiltração das células a partir da superfície das membranas. Desta forma garante-se que células encontradas na face inferior da membrana resultam de células que atravessaram a estrutura pelo processo natural de migração.

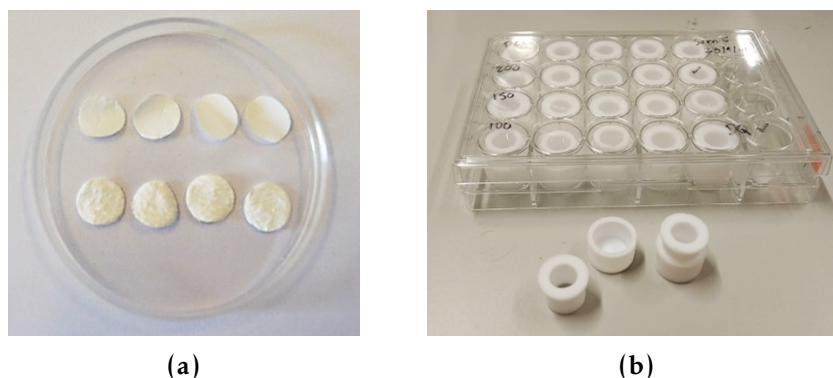


Figura 3.13: Amostras e materiais usados na cultura de células sobre as matrizes. (a) Membranas cortadas e separadas da folha de alumínio. (b) Peças de teflon e placa de 24 poços usados para suportar a cultura.

Após este procedimento prévio procedeu-se à sementeira das células sobre as membranas. Foram realizadas sementeiras com uma densidade celular entre 10^4 e 2×10^4 células/cm² para o estudo da viabilidade e infiltração celular. Para cada membrana usaram-se sete réplicas, e para o controlo de células foram utilizadas três réplicas semeadas diretamente nos poços da placa. As sementeiras decorreram durante um período de 14 dias, sendo que após o 1º, o 7º e o 14º dia, fixou-se uma amostra de cada condição com uma solução de 3,7% de paraformaldeído (PFA) diluído em PBS. A fixação das células consiste em inativar o metabolismo celular, assegurando que os constituintes celulares permaneçam intactos [90]. Este passo permite um acompanhamento do progresso da cultura através de marcações dos componentes celulares com fluoróforos, para posterior observação por microscopia de fluorescência.

De modo a garantir a viabilidade das respostas celulares foram realizadas pelo menos três sementeiras seguindo o mesmo procedimento. Os protocolos de esterilização, de descongelamento, sementeira e fixação de células encontram-se no anexo III. Todo este trabalho foi executado dentro da câmara de segurança microbiológica (Esco Labculture® Class II), no laboratório do Grupo de Engenharia de Tecidos (GREAT) da FCT/UNL.

3.4.2 Viabilidade Celular

A taxa de adesão e proliferação das células semeadas nas membranas e nos poços de controlo foram determinadas pela redução da resazurina. Este é um método colorimétrico de baixo custo, fidedigno e pouco citotóxico, que permite monitorizar a atividade metabólica das células com leituras de absorvância do meio [91].

A resazurina é uma molécula permeável que é reduzida a resorufina por células metabolicamente ativas (Figura 3.14). A conversão da resazurina a resorufina pode ser detetada pela alteração da cor do meio. Enquanto que a resazurina é um corante azul não fluorescente, a resorufina é um composto cor de rosa e florescente [92]. Sabendo que a quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis, é possível estimar a população de células através da medição da variação da absorvância. O gráfico da Figura 3.15, ilustra os espectros de absorvância da resazurina e da resorufina, com picos em 601 nm e 571 nm, respetivamente.

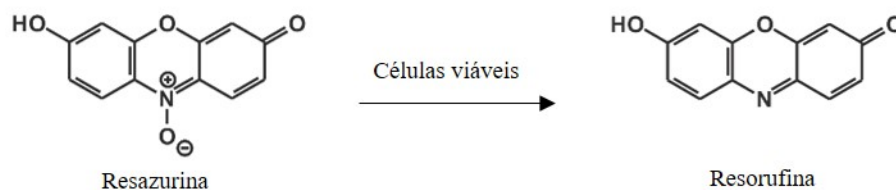


Figura 3.14: Redução da resazurina a resorufina por células metabolicamente ativas. (Adaptado de <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/2/382/htm>, consultado em 28/2/2019).

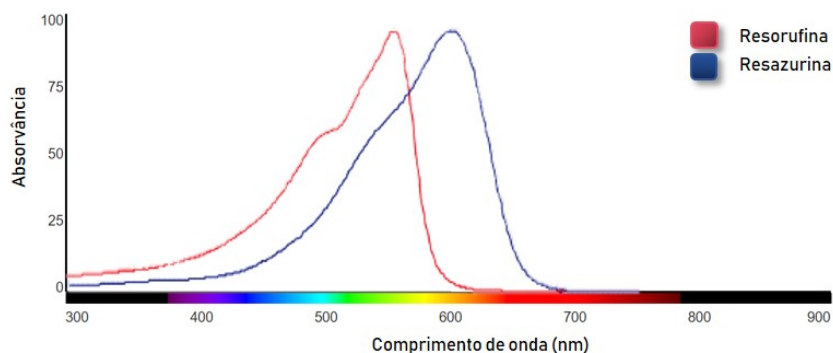


Figura 3.15: Espectros de absorção da resazurina e resorufina. O pico de absorvância teórico da resazurina ocorre a 601 nm, e a 571 nm para a resorufina. (Adaptado de <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf>, consultado em 28/2/2019).

Para os ensaios de viabilidade das células semeadas sobre as membranas, foi adicionada uma solução de resazurina a $0,04 \text{ mg.ml}^{-1}$ em cada um dos poços. Depois de três horas a incubar na estufa de CO_2 , as absorvâncias foram medidas no leitor de microplacas (Biotek ELX 800UV). A adesão celular foi analisada efetuando-se uma leitura 24 horas após a sementeira das células. Para a análise da proliferação foram realizadas leituras nos dias 4, 7, 10, 12 e 14 de cultura. O procedimento seguido para a realização dos ensaios da redução da resazurina encontra-se especificado no anexo III.

3.4.3 Morfologia Celular

Com o intuito de avaliar a morfologia das células, as amostras depois de fixadas foram observadas por microscopia eletrônica de varrimento utilizando o Zeiss DSM-96 descrito na secção 3.3.1. Para a observação dos constituintes celulares, as células foram marcadas com DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol) e calceína AM (calceína acetoxometilester), e observadas por microscopia ótica de fluorescência.

O DAPI emite fluorescência azul quando se liga às bases de adenina-timina do ácido desoxirribonucleico (ADN), permitindo assim marcar os núcleos das células. O seu espectro de fluorescência tem um máximo de absorção na região ultravioleta, a 358 nm, e um máximo de emissão na zona do azul, a 461 nm (Figura 3.16) [93].

A calceína AM é uma molécula não fluorescente que quando se difunde através da membrana celular é hidrolisada por enzimas intracelulares, as esterases, e convertida em calceína, que fica retida no citoplasma. A calceína por sua vez emite a 530 nm, produzindo fluorescência verde em células viáveis (Figura 3.16) [94].

Estas marcações foram analisadas pelo microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse TiS, e as imagens processadas no ImageJ. No anexo III encontram-se os protocolos experimentais utilizados nas marcações fluorescentes.

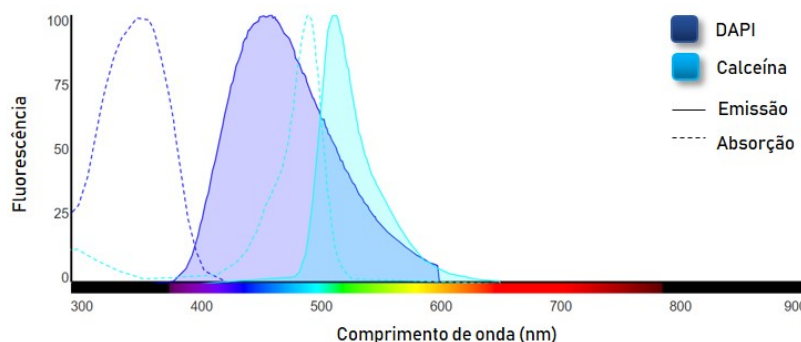


Figura 3.16: Espectros de fluorescência do DAPI e da calceína. Adaptado de <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?SID=srch-svtool&UID=SVbDNA>, consultado em 28/2/2019).

3.4.4 Infiltração Celular

Para apurar o potencial infiltrativo das células no interior das membranas, foram adotadas técnicas histológicas. O procedimento mais usado consiste no corte das amostras em secções muito finas, para serem posteriormente observadas ao microscópio com a adição de um corante. Este método permite obter secções histológicas transversais, dando a possibilidade de se analisar a distribuição e densidade de células ao longo da profundidade das membranas. O modo de preparação das secções foi realizado por congelamento das amostras, e com a utilização de um micrótomo próprio, o criostato. Este é um equipamento desenvolvido para a produção de cortes de tecidos congelados [95].

As amostras de matrizes combinadas com células depois de fixadas em PFA foram imersas numa solução crioprotetora de 30% de sacarose diluída em PBS. De seguida as amostras foram colocadas num molde, onde foi adicionado o meio de montagem OCT (*Optimum Cutting Temperature*), e congeladas a -80°C , formando um bloco de gelo. Posteriormente, cada amostra foi seccionada em fragmentos transversais por meio do criostato Leica CM3050 S. Os cortes foram recolhidos em lâminas de vidro carregadas positivamente, e previamente tratadas com um reagente de sililação para garantir uma melhor adesão do corte à lâmina (Figura 3.17).

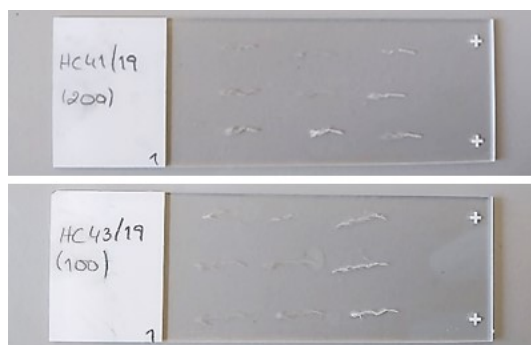


Figura 3.17: Lâminas de vidro usadas na recolha dos cortes com diferentes espessuras. Ilustração dos cortes aderidos às lâminas das amostras: PCL+CS200-150 e PCL+CS100-50. Para cada lâmina, os cortes de cima correspondem a 10 μm , os do meio a 20 μm e os de baixo a 30 μm .

Foram feitos cortes em triplicado com diferentes espessuras, 10, 20 e 30 μm , para averiguar qual a que permite uma melhor observação das células. Por fim, foi feita a coloração com DAPI para evidenciar os núcleos das células. Todo este procedimento foi realizado numa colaboração com o Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC), através da Dr.^a Teresa Barona e Dr.^a Ana Farinho.

Uma alternativa que se recorreu para analisar a capacidade infiltrativa das células foi a observação de células por microscopia confocal, recorrendo à marcação com a calceína. O microscópio confocal permite focar um ponto específico da amostra, utilizando iluminação laser. As imagens são adquiridas ponto-a-ponto para diferentes planos focais, possibilitando a reconstrução 3D da amostra [96].

Neste trabalho foi usado o microscópio confocal Zeiss LSM 700, aplicando um laser com um comprimento de onda de 488 nm (azul).

APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DE RESULTADOS

Neste capítulo será analisada a influência da incorporação dos grãos de CS numa matriz fibrosa de PCL. São apresentados e discutidos os resultados obtidos na caracterização física das membranas produzidas, bem como a resposta das células quando semeadas sobre as mesmas.

4.1 Produção e Caracterização das Matrizes

A produção das matrizes começou com a preparação dos grãos de CS, a determinação da densidade das soluções e a realização de um estudo de otimização das condições experimentais que levaram à deposição dos grãos a partir das fibras de PEO, em simultâneo com a fiação do PCL. Inicialmente os dois tipos de soluções foram estudados individualmente.

O ponto de partida das soluções de PEO+CS foi a eletrofiação apenas do PEO, na qual pretendeu-se descobrir a melhor combinação dos parâmetros de produção. Numa fase posterior foram adicionados grãos e os parâmetros foram ajustados a uma combinação única e transversal para todas as granulometrias. No que toca ao estudo da proporção, primeiro foram averiguados os limites que conduzem a uma deposição de PEO+CS viável. De seguida foram determinadas as respetivas densidades, a fim de se conseguir calcular o caudal necessário aplicar para produzir as razões mássicas dos polímeros pré-estabelecidas. Para a solução da PCL procurou-se encontrar parâmetros que permitiam uma largura de deposição no coletor aproximada à da deposição da solução PEO+CS. Uma vez descobertas as condições de processamento, estas permaneceram fixas em todas as deposições.

De modo a incorporar a variabilidade das deposições nos ensaios de caracterização física e biológica (ensaios *in vitro*), foram produzidas pelo menos quatro réplicas de cada tipo de matriz.

A densidade foi calculada experimentalmente para as soluções de PCL e de PEO+CS com diferentes concentrações de CS, 4%, 6% e 8%. Na Tabela 4.1 são apresentados os valores médios obtidos das medições efetuadas em triplicado. Independentemente de se variar a granulometria, admitiu-se a mesma densidade para as soluções em que a concentração se mantém igual, 4% de CS, PEO+CS200-150, PEO+CS150-100, PEO+CS100-50, PEO+CS50-0, PEO+CS1:0,5 e PEO+CS1:1.

Tabela 4.1: Valores obtidos para a densidade das diferentes concentrações das soluções usadas na produção das matrizes. Densidades, determinadas utilizando um picnômetro, e o desvio padrão da média.

Soluções	Concentração* %(m/m)	Densidade (g.ml ⁻¹)
PCL	20	1,229 ± 0,011
PEO+CS200-150	4	1,063 ± 0,006
PEO+CS150-100		
PEO+CS100-50		
PEO+CS50-0		
PEO+CS1:0,5		
PEO+CS1:1	6	1,080 ± 0,006
PEO+CS1:2		
PEO+CS1:3	8	1,092 ± 0,006

*A concentração refere-se ao polímero destacado com a cor vermelha.

Através destes valores é possível saber o caudal necessário estabelecer para se produzir membranas com as proporções de PCL:CS desejadas, 1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:3. Os restringimentos impostos pela viabilidade do processo de eletrofiação das soluções de PEO+CS, mais à frente mencionados, limitam a razão entre as massas de PCL e de CS nas membranas produzidas.

4.1.1 Análise Morfológica

Grãos

A Figura 4.1 ilustra a aparência do pó de CS vindo diretamente do fornecedor.



Figura 4.1: Imagem macroscópica do CS. Grãos de CS de origem.

Microscopicamente os grãos exibem geometrias variadas. A Figura 4.2, apresenta imagens de CS moído para a mesma ampliação, onde é possível ver as diferentes dimensões e geometrias dos grãos. A observação sob microscopia ótica permitiu ainda confirmar os tamanhos dos grãos de acordo com o intervalo de granulometria definido.

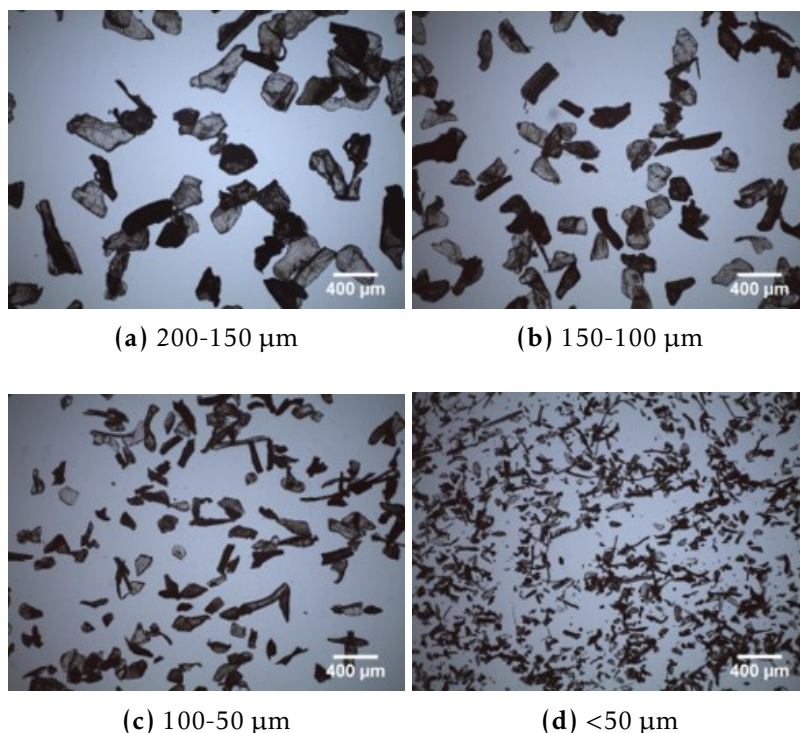


Figura 4.2: Imagens de microscopia ótica dos grãos de CS. Diferentes gamas de granulometrias obtidas pelo tratamento de moagem e peneiração dos grãos de CS. (Ampliação 4x).

Fibras

Durante a fase de ajuste dos parâmetros, à medida que se testavam várias condições experimentais, uma pequena quantidade de fibras era recolhida numa lâmina de vidro, colocada sobre o coletor e observada ao microscópio ótico.

Na solução de PCL as primeiras fibras obtidas em clorofórmio mostraram-se com diâmetros elevados, na ordem dos 5 µm (Figura 4.3a). Efetivamente, um solvente com menor condutividade provoca um menor estiramento do jato, sob efeito da diminuição das forças eletroestáticas repulsivas, resultando assim em fibras de diâmetros maiores [97]. Embora o clorofórmio seja um dos solventes mais comumente utilizado neste processo, ele é pouco condutor. Já com a solução preparada em AA, conseguiu-se encontrar um conjunto de parâmetros que conduziu a deposições estáveis, com fibras regulares, distribuídas uniformemente pelo coletor, e diâmetros mais próximos das proteínas fibrosas da MEC, tal como é possível confirmar nas imagens de microscopia ótica da Figura 4.3b.

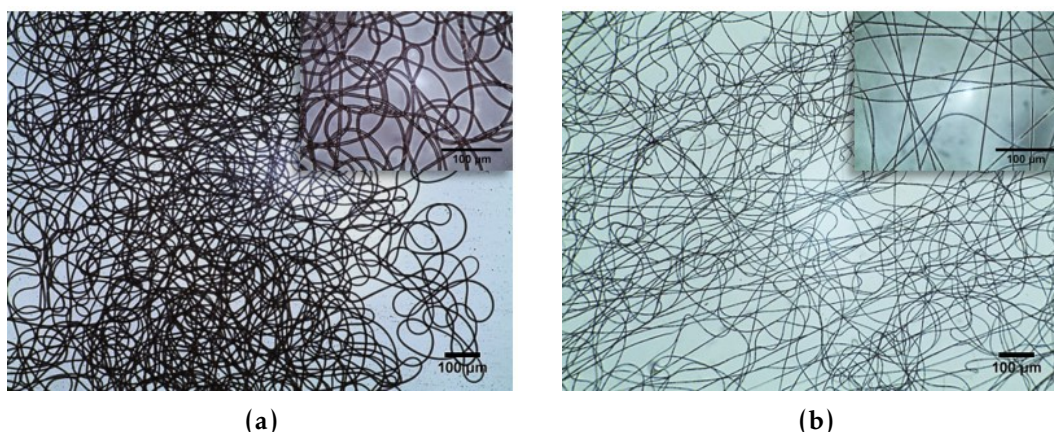


Figura 4.3: Fibras de PCL depositadas a partir de uma solução preparada em diferentes solventes. Imagem microscópica de: (a) PCL a 10% em clorofórmio, a $0,7 \text{ ml.h}^{-1}$, 25 cm, 13 kV, e (b) PCL a 20% em água e etanol, a $0,3 \text{ ml.h}^{-1}$, 23 cm e 10 kV. (Ampliação 10x e 40x).

O estudo inicial da deposição dos grãos de CS também começou com uma solução de PEO dissolvido em clorofórmio. Porém, problemas iniciais provocados por esta mistura, deram origem a uma eletrofiação instável na presença dos grãos de CS. Por outro lado, com a água e etanol, obtiveram-se fibras mais consistentes no transporte dos grãos, e uma deposição mais uniformemente distribuída pelo coletor. Para esta solução, o ajuste dos parâmetros experimentais começou pela eletrofiação apenas da solução de PEO, a partir da qual as fibras mostraram-se regulares (Figura 4.4). Após a adição dos grãos de CS, consoante a variação de cada parâmetro, observou-se estabilidade na deposição para concentrações de CS inferiores a 8%, e para caudais até aos 3 ml.h^{-1} . Fora destes limites o processo tornava-se instável, surgindo fenómenos de deposição irregular e restrita a uma pequena largura no coletor, e ainda o entupimento do interior da seringa pelos grãos.

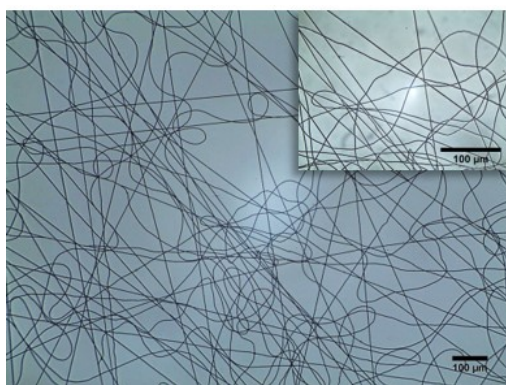


Figura 4.4: Fibras de PEO de uma solução preparada com uma mistura de água e etanol. Imagem microscópica de uma deposição de 4,2% de PEO a 2 ml.h^{-1} , 33 cm e 15 kV. (Ampliação 10x e 40x).

Matrizes

Algumas imagens da deposição de PCL simultânea à deposição da solução de PEO com os grãos de CS, encontram-se na Figura 4.5. A co-deposição utilizando o clorofórmio em ambas as soluções, tal como experimentado inicialmente, encontra-se ilustrada na Figura 4.5a. Nesta observou-se a evaporação incompleta do solvente da solução de PEO durante o trajeto até ao coletor. Este fenómeno provoca a dissolução de fibras de PCL, e como consequência estas acabam por fundir e deformar. Quanto à co-deposição da solução de PCL dissolvida em AA e de PEO em água e etanol, mostrada na Figura 4.5b, nas regiões junto aos grãos de CS a mistura de solventes da solução de PEO também não evapora totalmente, no entanto como a PCL é insolúvel nestes solventes, as fibras para este caso mantiveram a sua forma.

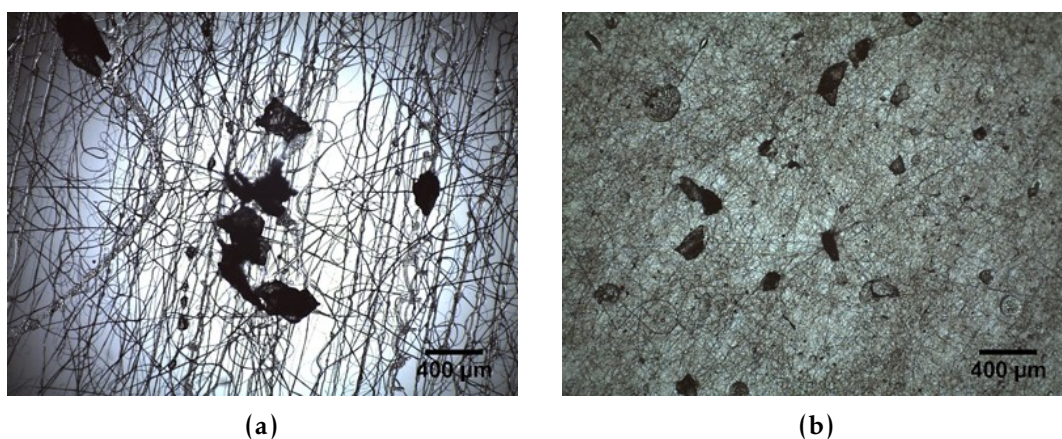
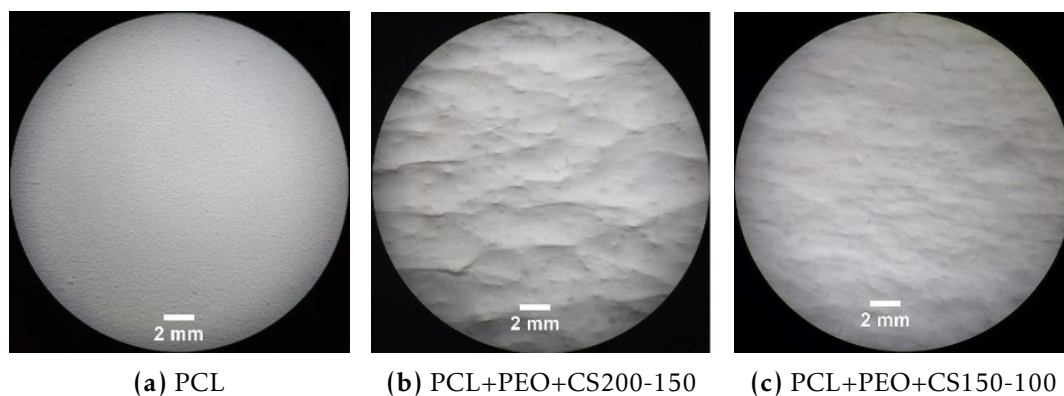


Figura 4.5: Co-eletrofiação das soluções de PCL e de PEO+CS, preparadas em diferentes solventes. Imagem microscópica de (a) PCL 10% em clorofórmio e PEO 1% também em clorofórmio com grãos de [200-150] μm ; (b) PCL 20% em AA, e PEO 4% em água e etanol, com grãos de [100-50] μm . (Ampliação 4x).

Após o aperfeiçoamento das condições de produção para cada solução, as matrizes foram co-eletrofiadas durante quatro horas contínuas. Macroscopicamente é perceptível a presença de grãos na membrana. Estes conferem alguma rugosidade à superfície comparativamente a uma membrana apenas de PCL. Com recurso ao estereoscópio é possível confirmar esta mesma configuração (Figura 4.6).



(a) PCL

(b) PCL+PEO+CS200-150

(c) PCL+PEO+CS150-100

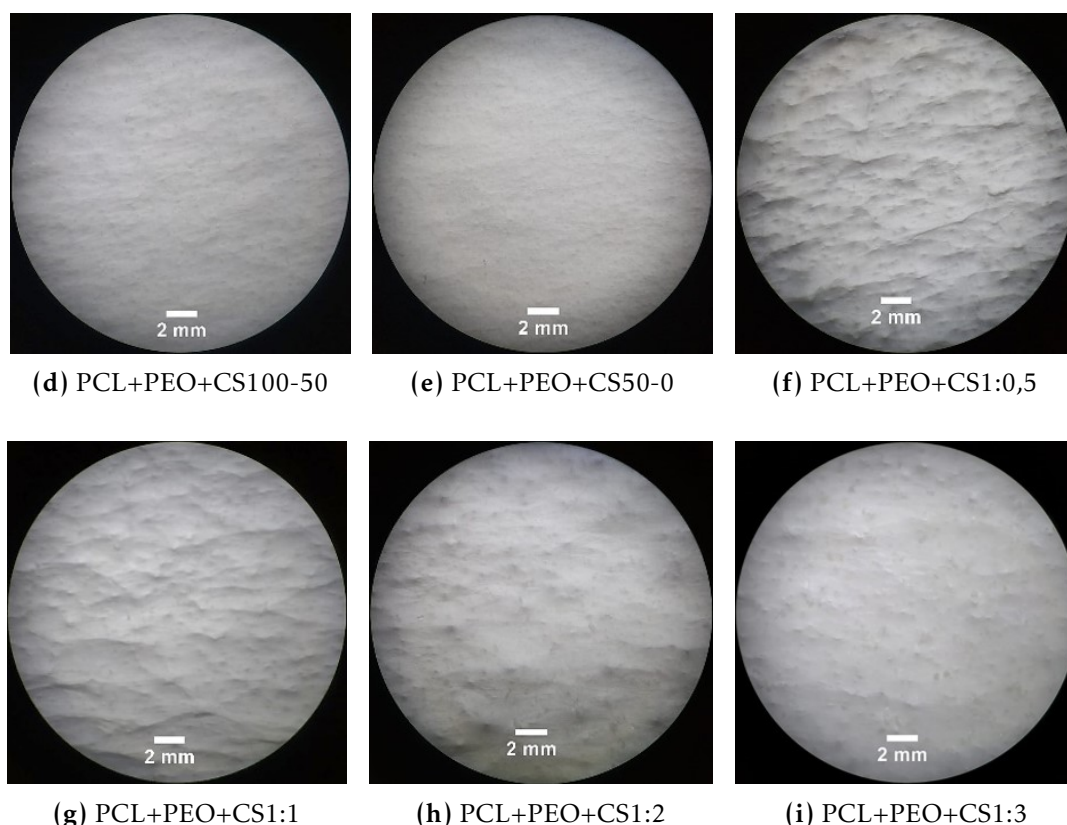


Figura 4.6: Superfície das membranas produzidas pela eletrofiação de PCL e co-eletrofiação de PCL e PEO+CS. Imagens microscópicas do detalhe das superfícies resultantes da deposição sobre a folha de alumínio de cada condição. (Ampliação 1x).

O MEV permitiu extrair informações mais pormenorizadas relativamente à superfície das matrizes, no que toca à distribuição, morfologia e diâmetros dos grãos de CS e das fibras de PCL. As imagens adquiridas por este equipamento revelaram uma incoerência na quantidade de grãos presentes nas amostras quando produzidas por co-eletrofiação na horizontal. Este dado denunciou a perda de grãos durante o percurso da solução até ao coletor. Posto isto, no sistema final foi predefinida a orientação vertical para a deposição da solução de PEO+CS.

A Figura 4.7 ilustra a topografia da matriz de PCL. A partir da imagem de maior ampliação é possível identificar a presença de umas fibras mais finas que outras. A representação gráfica dos diâmetros das fibras foi obtida pela realização de 50 medições, e apresenta-se na Figura 4.8. Ao construir o histograma observa-se que a distribuição dos diâmetros apresenta dois picos diferentes. Este comportamento pode ter resultado da degradação do polímero pelo AA. O meio ácido do próprio solvente, utilizado para dissolver o PCL, catalisa a quebra das ligações éster, conduzindo à diminuição da massa molecular do polímero [98]. Como consequência, esta degradação hidrolítica ao alterar a cadeia molecular, pode levar à inconsistência do jato na eletrofiação da solução e, por sua vez, à deposição de fibras com diferentes tamanhos.

Apesar da degradação, as fibras de PCL possuem diâmetros com uma distribuição entre os 0,32 e 1,88 μm , apresentando um diâmetro médio de $1,16 \pm 0,44 \mu\text{m}$. Este resultado está dentro da gama dos valores reportados na literatura, para soluções de 20% de PCL em AA [71, 98–100].

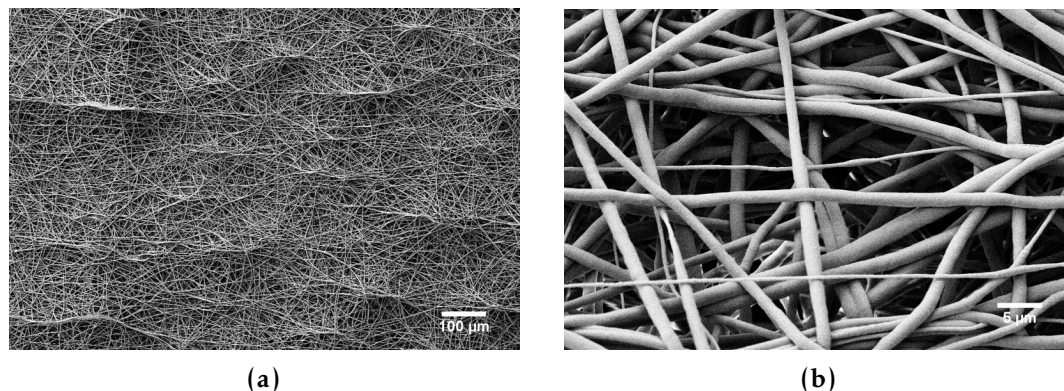


Figura 4.7: Imagens de MEV da membrana de PCL. (a) Ampliação 100x; (b) Ampliação 2.000x.

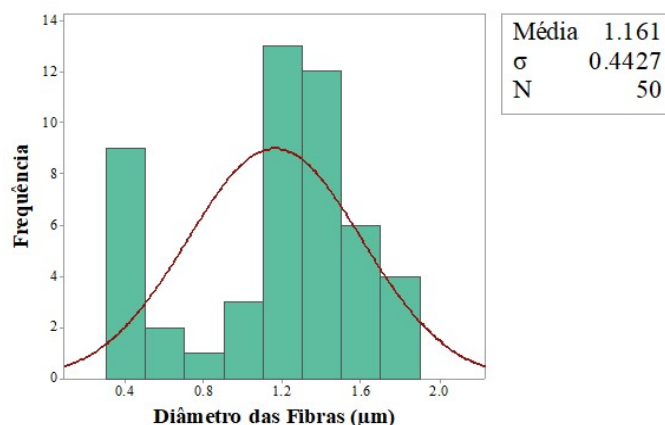


Figura 4.8: Representação gráfica da distribuição dos diâmetros das fibras de PCL. Histograma, com a curva de normalização, dos valores dos diâmetros das fibras a partir de 50 medidas realizadas sobre a imagem de MEV.

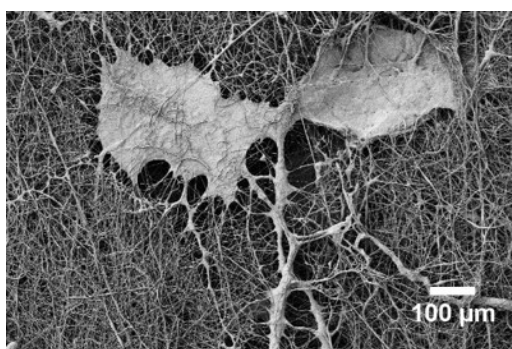
Outro aspeto a realçar é as irregularidades denotadas pela imagem de menor ampliação, que correspondem a zonas de fibras aglomeradas. Este padrão atípico pode ser explicável pela diferença dos diâmetros das fibras. As zonas correspondentes a diâmetros maiores terão maior relevo, pelo que irão ser um ponto de atração uma vez que estão mais próximas da seringa.

Em relação à espessura, a membrana de PCL possui aproximadamente uma espessura média de $0,09 \pm 0,02 \text{ mm}$, enquanto que as membranas que contêm os grãos têm espessuras que vão desde os 0,44 aos 1,33 mm. A título de comparação, a derme regista uma espessura entre 1 mm e 4 mm [101].

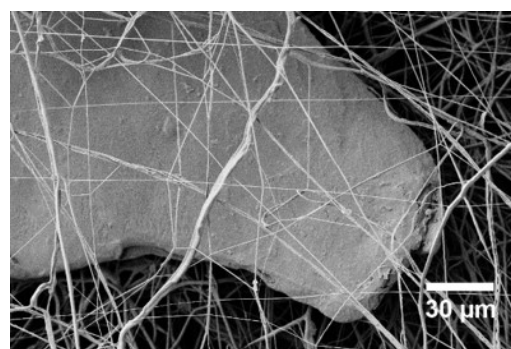
Para a análise morfológica das membranas com os grãos de CS, também foram recolhidas imagens de MEV para as oito membranas diferentes, de modo a ilustrar à microescala o efeito da granulometria e o efeito da variação da proporção mássica dos polímeros na estrutura das membranas. Foram ainda preparadas amostras de deposições de 30 minutos apenas com a solução de PEO+CS e amostras das membranas co-eletrofiadas, lavadas com água ultrapura e deixadas a secar, a fim de detetar eventuais alterações morfológicas.

i) Efeito da granulometria:

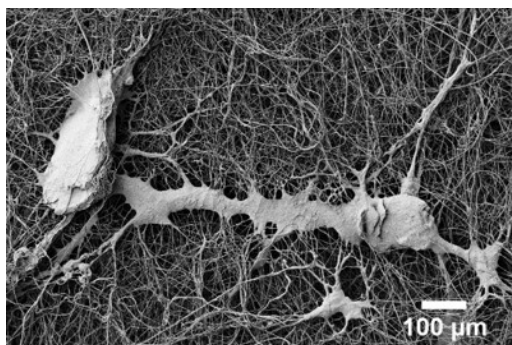
As imagens da Figura 4.9 evidenciam a incorporação dos grãos de CS na superfície das membranas com diferentes granulometrias, PCL+PEO+CS200-150, PCL+PEO+CS150-100, PCL+PEO+CS100-50 e PCL+PEO+CS50-0. Como é perceptível, o tamanho dos grãos está de acordo com a designação da respetiva membrana, dado que para uma mesma ampliação os grãos são cada vez mais pequenos (Figura 4.9a, 4.9c, 4.9e e 4.9g). Para comprovar esta afirmação, os diâmetros dos grãos foram medidos recorrendo às ferramentas de medida do ImageJ. A partir destas imagens, também é possível observar a interação das fibras com os grãos, havendo tanto grãos praticamente expostos à superfície, como grãos cobertos por fibras, e para além disto, é visível a existência de grãos em aglomerados. Consegue-se detetar ainda um arrasto e acumulação da solução encarregue pelo transporte dos grãos, o PEO, à volta dos mesmos.



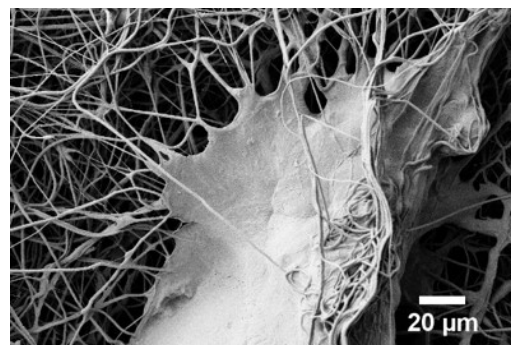
(a)



(b)



(c)



(d)

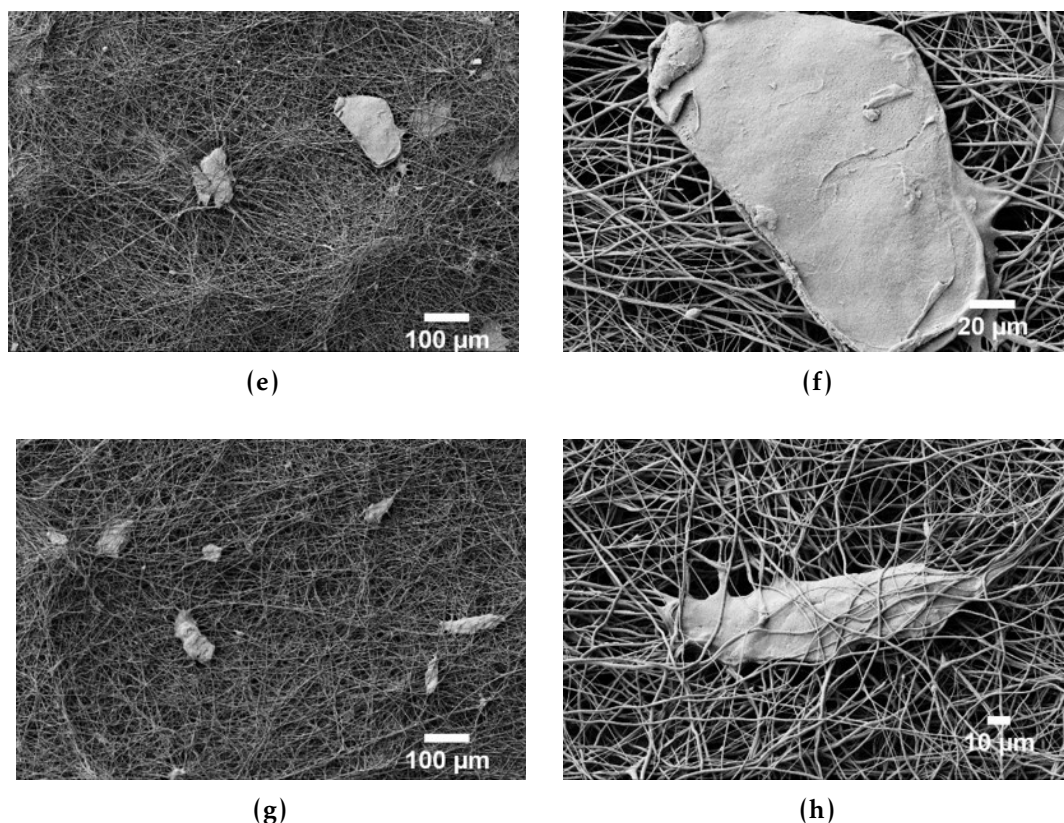
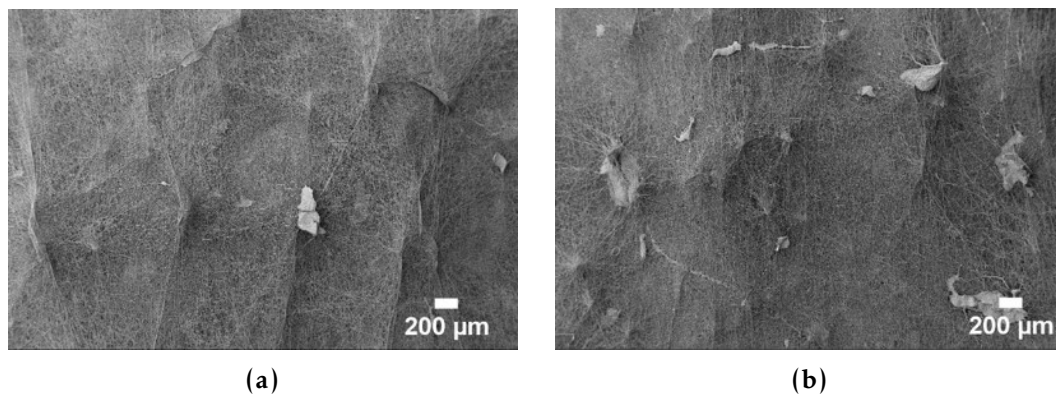


Figura 4.9: Imagens de MEV das membranas de PCL+PEO+CS com variação da granulometria dos grãos de CS. Membrana de: (a-b) PCL+PEO+CS200-150, (c-d) PCL+PEO+CS150-100, (e-f) PCL+PEO+CS100-50, e (g-h) PCL+PEO+CS50-0. (Ampliação 100x e 500x).

ii) Efeito da proporção:

Na Figura 4.10 pode-se ver as superfícies das membranas com diferentes razões mássicas, PCL+PEO+CS1:0,5, PCL+PEO+CS1:1, PCL+PEO+CS1:2 e PCL+PEO+CS1:3. Estas imagens de MEV têm menor ampliação de modo a permitir aumentar o campo de visão da estrutura, para dar uma maior sensibilidade à variação da quantidade de grãos. Como é visível, os grãos encontram-se distribuídos aleatoriamente pela estrutura em diferentes proporções, consoante a respetiva membrana.



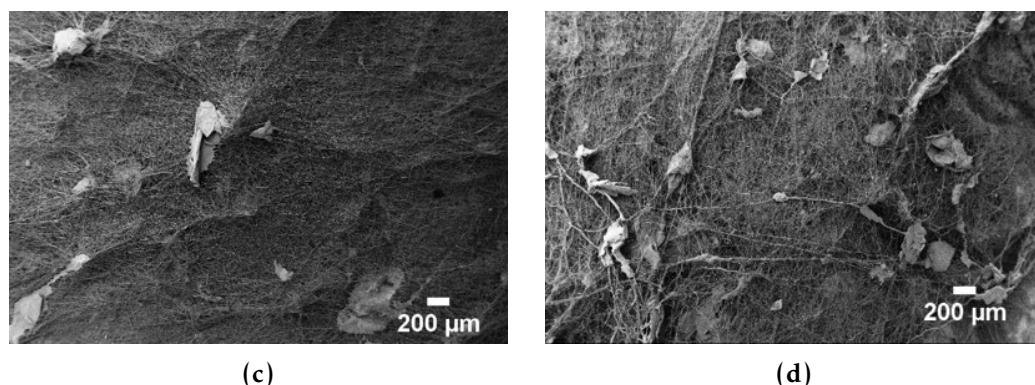


Figura 4.10: Imagens de MEV das membranas de PCL+PEO+CS com variação da concentração dos grãos de CS. Membrana de: (a) PCL+PEO+CS1:0,5, (b) PCL+PEO+CS1:1, (c) PCL+PEO+CS1:2, e (d) PCL+PEO+CS1:3. (Ampliação 25x).

iii) Efeito das fibras de PCL e de PEO:

Algumas imagens que representam a superfície das amostras produzidas apenas com a solução de PEO+CS e das amostras com as fibras de PEO removidas, encontram-se na Figura 4.11. Do ponto de vista morfológico, comparando as imagens de MEV de PEO+CS com as de PCL+PEO+CS observou-se uma estrutura ligeiramente menos densa, provocada pela ausência das fibras de PCL. Por outro lado, as imagens relativas às membranas depois de hidratadas aparentam estar relativamente mais compactas. Este fenômeno talvez se deva ao processo de secagem que colapsou a estrutura, mas outros estudos documentaram, com a análise qualitativa das imagens de MEV, que as membranas pareciam menos densas e mais porosas, após a remoção de PEO [102, 103].

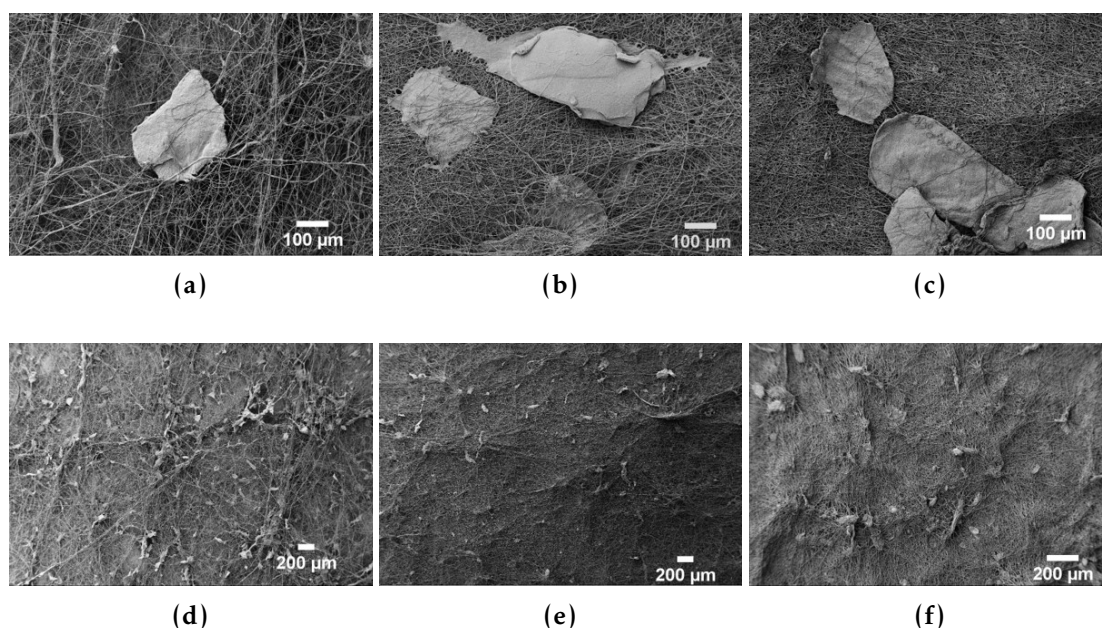


Figura 4.11: Imagens de MEV de membranas de PCL+PEO+CS sem as fibras de PCL (PEO+CS) e sem as fibras de PEO (PCL+CS). Membrana de: (a) PEO+CS200-150, (b) PCL+PEO+CS200-150, (c) PCL+CS200-150, (d) PEO+CS1:0,5, (e) PCL+PEO+CS1:0,5, (f) PCL+CS1:0,5 (Ampliação 100x e 25x).

4.1.2 Ensaios de Tração

As propriedades mecânicas das membranas de nanofibras são essenciais para o sucesso da sua aplicação em tecidos. Além do mais, um *scaffold* com poros maiores, apesar de favorecer a resposta celular, pode comprometer o seu comportamento mecânico. Como tal, é necessário haver um equilíbrio entre uma estrutura com poros adequados e uma estrutura mecanicamente estável. Estes ensaios permitem assim averiguar se as membranas estão aptas para uso como substituto de pele, verificando a influência da presença dos grãos de CS.

A Figura 4.12 mostra a deformação sofrida pelas amostras durante o ensaio de tração. O gráfico com as respetivas curvas de tração apresenta-se na Figura 4.13. Todas as curvas evoluem de um segmento linear inicial, correspondente à região elástica, seguido da cedência e da deformação plástica, caracterizada pelo aumento da deformação devido a um menor aumento da tensão de carga. No início as fibras orientam-se segundo a direção do alongamento, sendo a resposta influenciada pelas interações entre fibras. Para tensões maiores ocorre a quebra das pontes de contacto juntamente com a rutura das fibras [104, 105].

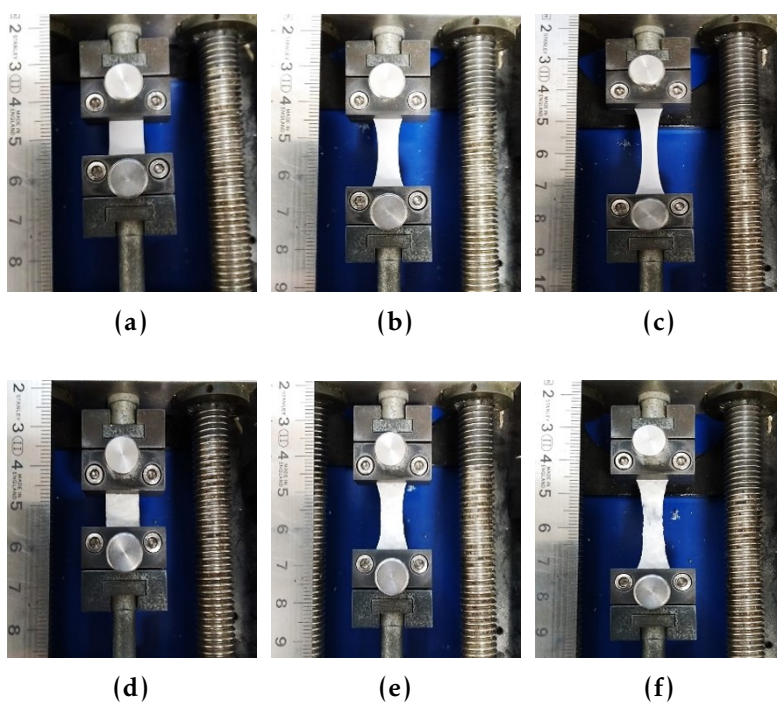


Figura 4.12: Tração de uma amostra de PCL e de PCL+PEO+CS1:3. Deformação da amostra de PCL para (a) 0 min., (b) 5 min., (c) 10 min., após o início do ensaio. Para a amostra de PCL+PEO+CS1:3, (d), (e) e (f), registaram-se os mesmos tempos, mas a rutura da mesma ocorre mais cedo.

Considerando a curva de tração da PCL, esta exibe uma maior resistência mecânica comparativamente às membranas de PCL+PEO+CS. Este facto poderá ser justificado pela presença dos grãos, que não contribuem para a resposta mecânica das fibras, e por sua vez a resistência mecânica da estrutura. Dentro das matrizes com os grãos, é visível a

diminuição gradual da tensão com o aumento do número de grãos na amostra, ou seja, as matrizes PCL+PEO+CS1:3 são menos resistentes, seguidas das matrizes PCL+PEO+CS1:2, PCL+PEO+CS1:1 e PCL+PEO+CS1:0,5. Relativamente às restantes matrizes com grãos, a menor granulometria ($<50\ \mu\text{m}$) é a que suporta uma maior carga, e assim sucessivamente. Seguindo o mesmo raciocínio, grãos maiores implicam teoricamente uma estrutura mais “aberta”, o que a torna mais frágil.

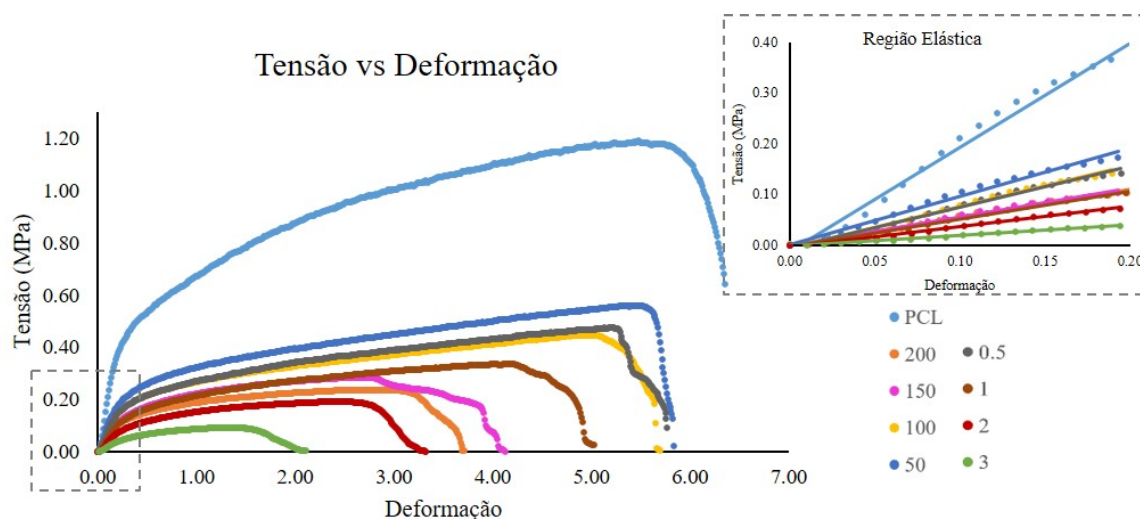


Figura 4.13: Curvas de tração típicas para as diferentes membranas. No canto superior direito encontra-se a região elástica ampliada, e os respectivos ajustes lineares.

A partir das curvas de tensão vs. deformação determinaram-se os valores médios do módulo de Young para cada membrana. Os resultados obtidos encontram-se entre os 0,24 MPa e os 3,13 MPa, estando registados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Módulo de Young para as diferentes matrizes. Grandeza determinada a partir da média de dez ensaios de tração.

Soluções	Módulo de Young (MPa)
PCL	$3,13 \pm 0,37$
PCL+PEO+CS200-150	$0,79 \pm 0,16$
PCL+PEO+CS150-100	$0,84 \pm 0,12$
PCL+PEO+CS100-50	$0,94 \pm 0,12$
PCL+PEO+CS50-0	$0,96 \pm 0,18$
PCL+PEO+CS1:0,5	$0,92 \pm 0,17$
PCL+PEO+CS1:1	$0,78 \pm 0,08$
PCL+PEO+CS1:2	$0,45 \pm 0,06$
PCL+PEO+CS1:3	$0,24 \pm 0,04$

Nas membranas com variação da granulometria os módulos de Young não diferem muito entre si. A semelhança entre estes valores indica que a alteração dos grãos não produz um efeito significativo sobre o módulo de Young das membranas. Quanto à alteração da proporção existe alguma diferença. Dentro deste mesmo conjunto, verifica-se que uma maior quantidade de grãos remete para um módulo de Young menor.

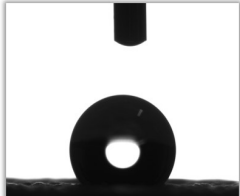
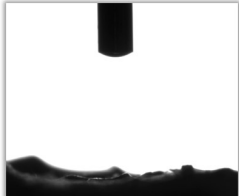

Por outro lado, a membrana de PCL destaca-se em relação às membranas com CS e PEO, por apresentar um módulo de Young mais elevado. Em respeito ao solvente utilizado, e em geral, às condições experimentais, várias fontes reportam um módulo de Young de matrizes de fibras de PCL tipicamente entre 2 e 10 MPa [98]. Dos poucos trabalhos que utilizam PCL dissolvido em AA encontram-se valores entre 4,7 e 6,8 MPa [71, 98]. Assim, é possível concluir que o módulo de Young obtido para a membrana de PCL vai de encontro aos valores registados na literatura.

No que diz respeito à pele, esta envolve diferentes contribuições das fibras de elastina e colagénio na sua resposta mecânica. Este aspeto traduz-se numa região elástica não linear. Estudos biomecânicos realizados por Silver *et al.* em pele humana, revelam módulos de Young de 0,1 MPa para deformações abaixo de 0,4, e 18,8 MPa para deformações acima de 0,4 [101]. O facto de a gama de valores obtidos para o módulo de Young no presente trabalho se inserir dentro deste intervalo, sugere que as membranas produzidas possuem resistência mecânica suficiente para serem usadas como substitutos de pele.

4.1.3 Ângulo de Contacto

Para apurar o tamanho médio de poro foi necessário determinar previamente o ângulo de contacto. Esta análise permitiu ainda avaliar o efeito da incorporação dos grãos de CS na hidrofiliicidade das membranas. A tabela seguinte apresenta os valores medidos do ângulo de contacto das diferentes amostras preparadas.

Tabela 4.3: Ângulo de contacto obtido para as diferentes amostras preparadas. Os dados da membrana e filme de PCL dizem respeito a uma média de dez ensaios. Todas as membranas de PCL+PEO+CS apresentaram um ângulo de contacto de 0°, em três zonas distintas.

Amostra:	Membrana de PCL	Membrana de PCL+PEO+CS	Filme de PCL
	(132 ± 4)°	0°	(53 ± 2)°
Ângulo de contacto			

Resultados idênticos para a membrana de PCL, eletrofiada a partir de uma solução dissolvida em AA, foram relatados por outros autores, que obtiveram ângulos de contacto de $(129 \pm 2)^\circ$ e $(124 \pm 3)^\circ$ [100, 106]. Estes valores fazem sentido dada a natureza hidrofóbica do polímero que compõe as fibras desta membrana, a PCL. Para as membranas de PCL+PEO+CS, em todas as respetivas amostras foi colocada uma gota de água em três zonas distintas, tendo esta sido absorvida por completo em poucos segundos. Com este resultado seria sensato pensar que o PEO e o CS foram responsáveis por tornar a membrana de PCL+PEO+CS hidrofílica. No entanto, o ângulo de contacto nulo será devido à presença de fibras de PEO, solúveis em água e, teoricamente, ao aumento da porosidade da estrutura, causada pela adição dos grãos de CS. Quer isto dizer que, as fibras de PCL destas membranas não sofreram alterações que justifiquem a mudança do seu carácter hidrofóbico.

Quanto ao filme de PCL, importa relembrar que para este ensaio foi doseada uma gota do líquido usado para a caracterização do poro, ou seja, etanol a 10%. Verifica-se que o ângulo de contacto desta amostra é 2,5 vezes menor do que o ângulo de contacto da membrana de fibras de PCL. Apesar de uma superfície ser rugosa e outra lisa, podendo afetar o espalhamento do líquido e consequentemente diminuir o ângulo, este resultado é explicável pelas diferenças da natureza química das gotas. Tendo em conta que o ângulo de contacto depende da tensão superficial, a água ao ter uma tensão superior ao etanol, exibirá um ângulo de contacto maior [17]. Assim, é natural que para o filme de PCL, com uma gota de etanol a 10%, se obtenha um ângulo menor.

4.1.4 Tamanho Médio de Poro

Uma membrana com poros de tamanho adequado e conectados, desempenha um papel essencial na capacidade de infiltração das células. Apesar da importância da determinação do tamanho de poro, esta é uma propriedade difícil de medir.

Um dos objetivos deste trabalho passa pela estimativa do tamanho médio de poro das membranas, pelo método do ponto de bolha, descrito no capítulo Materiais e Métodos. Para isso, efetuaram-se primeiro testes com amostras de filtros. Utilizaram-se filtros com poros definidos de 2-3 μm da PratDumas, <11 μm e <22 μm da Whatman. Dada a natureza hidrofílica destes materiais, o solvente usado foi água destilada.

No decorrer dos ensaios encontraram-se algumas dificuldades nas medições das amostras embebidas. Com o aumento da pressão, os poros abrem, causando uma descida abrupta da pressão. Este fenómeno torna complicada a recolha dos valores de pressão e caudal com precisão, havendo por isso, alguma irreprodutibilidade dos resultados. Outro problema associado a este sistema de montagem inclui pequenas fugas de ar que podem afetar os resultados de porosimetria. Alguns dos gráficos correspondentes às amostras dos filtros apresentam-se na Figura 4.14.

4.1. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES

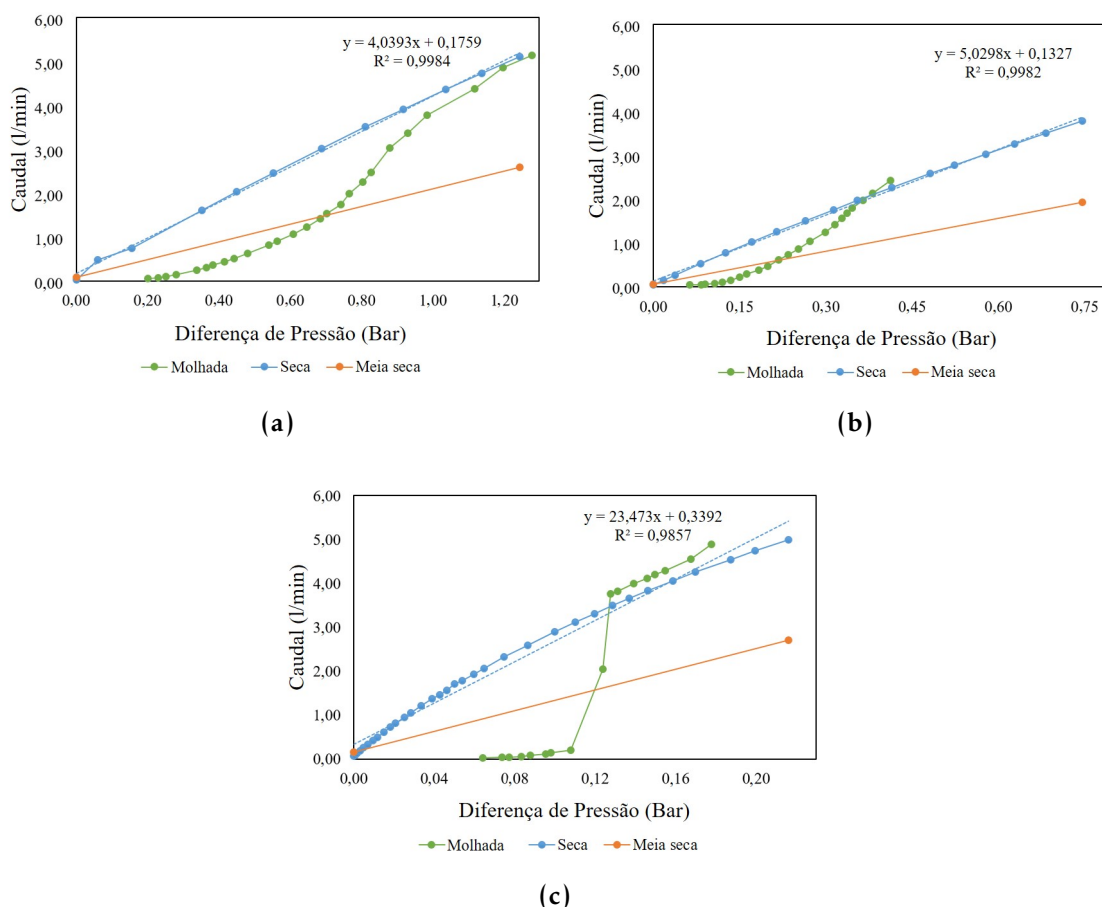


Figura 4.14: Curvas experimentais do método do ponto de bolha aplicado às amostras de filtros. Um dos resultados obtidos para o filtro de 2-3 μm (a), <11 μm (b) e <22 μm (c), tendo sido obtido um tamanho médio de poro de 4,17 μm , 13,32 μm e 25,15 μm , respetivamente.

Analisando os gráficos para os diferentes filtros é possível, de facto, verificar que quanto maior o tamanho de poro da amostra, menor é a pressão correspondente ao ponto de bolha. A partir destes foi possível determinar o tamanho médio de poro, pelo ponto de interseção entre a curva molhada e a curva meia seca. A média dos resultados obtidos para cada um dos filtros encontra-se na tabela 4.4. Comparando estes valores experimentais com os valores tabelados é possível constatar alguma discrepância, podendo indicar que o sistema de montagem não se encontra devidamente adaptado. É de notar que, o facto de este método assumir a forma do poro como um cilindro, é obtida uma estimativa do diâmetro médio de poro por excesso [107].

Tabela 4.4: Média dos valores obtidos do tamanho médio de poro para os diferentes filtros.

Filtros	Tamanho médio de poro (μm)	Nº de ensaios
2-3 μm	$4,3 \pm 1,4$	16
<11 μm	$15,9 \pm 4,4$	7
<22 μm	$24,6 \pm 0,8$	2

Realizaram-se alguns testes para as amostras das membranas produzidas neste trabalho, tendo sido obtidas curvas em que não se atingiu o ponto de interseção que dita o tamanho médio de poro, tal como representado nos gráficos da Figura 4.15. Esta situação advém do facto de se ter chegado ao valor máximo que o caudalímetro usado consegue medir. A necessidade de aumentar o caudal aplicado poderá ser indicativo de uma amostra com um maior número de poros, uma vez que este parâmetro relaciona-se com a distribuição do tamanho de poro. Mediante este contratempo, o procedimento para a determinação do poro das membranas produzidas não ficou operacional.

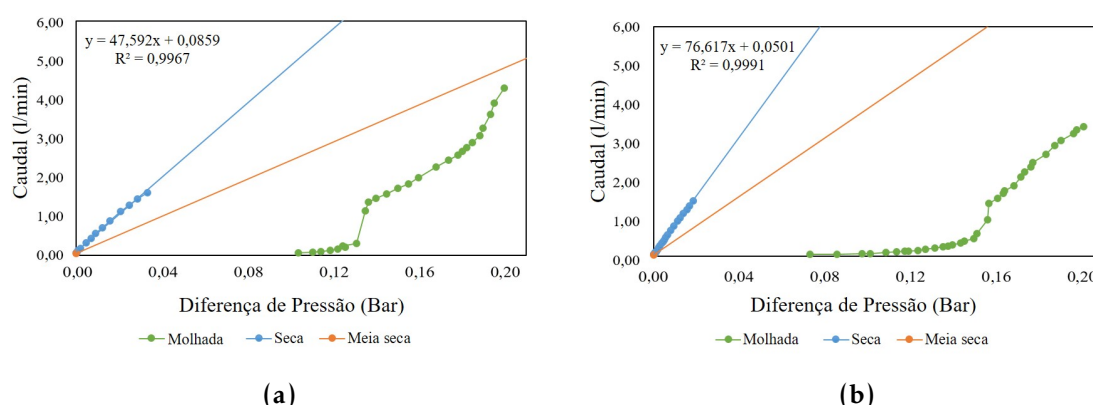


Figura 4.15: Curvas experimentais do método do ponto de bolha aplicado às membranas produzidas. Resultados obtidos para: (a) uma membrana de PCL, e (b) para uma membrana de PCL+PEO+CS1:0,5.

4.1.5 Permeabilidade ao Vapor de Água

Após uma lesão cutânea, a perda de água a partir da superfície da ferida pode ser muito elevada, ao ponto de gerar um microambiente prejudicial à função e sobrevivência das células regeneradoras. Logo, um dos requisitos nos substitutos de pele é conseguir controlar os níveis de humidade [85].

A permeabilidade das membranas foi analisada a partir da determinação da taxa de transmissão de vapor de água. A Figura 4.16 representa a perda de massa de água por evaporação nos diferentes intervalos de tempo, depois de as membranas serem expostas a um ambiente de humidade e temperatura específicos. Numa visão geral, pode-se afirmar que todas as membranas produzidas permitem reduzir o ritmo a que a água é transmitida, quando comparando com o controlo. Porém, a incorporação dos grãos não tem um efeito determinante sobre essa transmissão, nem mesmo a sua variação, quer em granulometria quer em concentração.

Os resultados relativos ao WVTR estão expressos na Tabela 4.5.

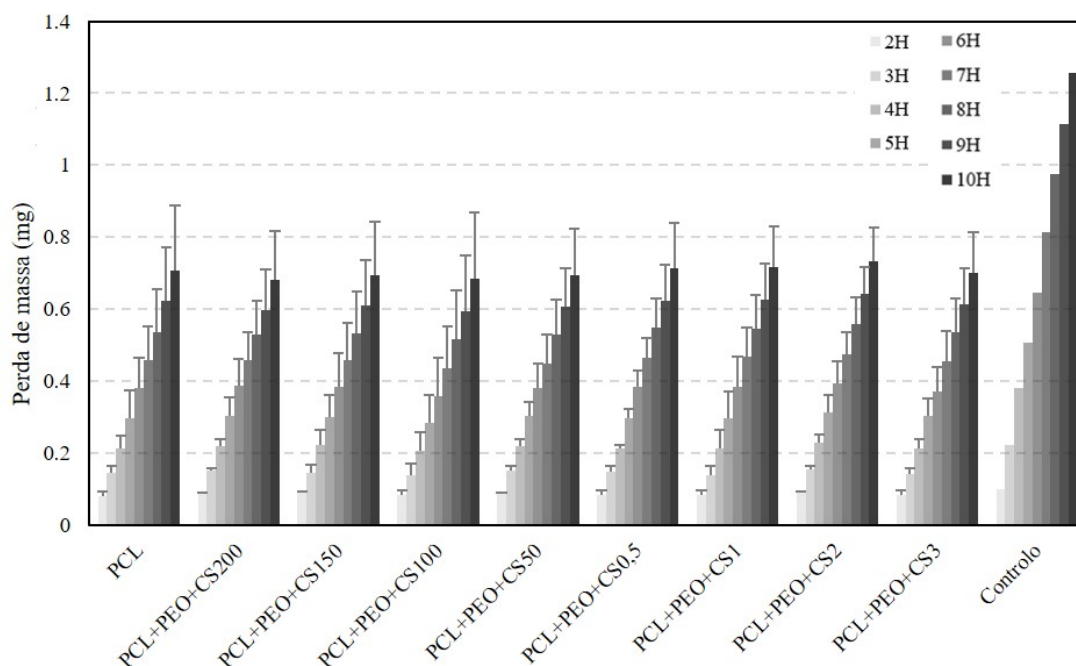


Figura 4.16: Representação da evolução da transmissão de vapor de água de cada membrana ao longo de 10 h. Média das perdas de massa de água por evaporação de quatro ensaios, e apenas um ensaio no controlo. Por questões de ambientação das membranas, assumiu-se o valor da primeira hora como um *outlier*.

Tal como ilustrado graficamente pela Figura 4.16, os WVTR's obtidos são praticamente iguais para todas as membranas. Eventualmente, dada a natureza hidrofóbica da PCL, seria de esperar uma permeabilidade menor para esta membrana relativamente às restantes. No entanto, a sua elevada porosidade (aproximadamente 80%) [71], poderá contrabalançar este aspeto e permitir a difusão do vapor de água através da estrutura. Posto isto, é possível concluir que a presença dos grãos de CS não interferiu na permeabilidade ao vapor de água.

Tabela 4.5: Taxa de transmissão de vapor de água (WVTR) para cada membrana.

Membranas	WVTR (g/m ² /dia)
PCL	1160 ± 118
PCL+PEO+CS200-150	1099 ± 106
PCL+PEO+CS150-100	1123 ± 112
PCL+PEO+CS100-50	1122 ± 131
PCL+PEO+CS50-0	1100 ± 106
PCL+PEO+CS1:0,5	1166 ± 124
PCL+PEO+CS1:1	1184 ± 125
PCL+PEO+CS1:2	1178 ± 117
PCL+PEO+CS1:3	1194 ± 123
Controlo	2144 ± 150

Na prática, o WVTR deve ser elevado, a fim de impedir a maceração da ferida, e a acumulação de elementos biológicos, e baixo o suficiente para evitar a desidratação [86]. Segundo L.-O. Lamke *et al.*, a pele normal tem um WVTR de 204 ± 12 g/m²/dia. Consoante o estado de uma ferida os valores podem ir de 278 ± 26 g/m²/dia para lesões superficiais, até 5138 ± 202 g/m²/dia para lesões granulares [108]. A gama de WVTR's obtidos indica que as membranas produzidas são mais adequadas para feridas com um exsudado moderado. Para feridas altamente exsudativas o WVTR é maior, pelo que nesse caso estas membranas poderiam reter excesso de humidade e de elementos biológicos entre o leito da ferida e o substituto, prejudicando o processo de cicatrização.

4.2 Testes *In Vitro*

Na expectativa de as membranas produzidas conferirem um ambiente propício à povoação das células em toda a sua dimensão, torna-se necessário a realização dos ensaios *in vitro*. Nesta análise as células foram semeadas sobre as diferentes membranas, e avaliadas quanto à sua adesão, proliferação e infiltração, através da quantificação de um indicador metabólico das células ativas e da observação microscópica das mesmas.

4.2.1 Viabilidade Celular

Como referido anteriormente, a viabilidade celular foi determinada utilizando a resazurina. A adesão das células foi avaliada 24 h após a sementeira, e a proliferação foi avaliada repetindo o ensaio a cada 2-3 dias de cultura. Assumindo que as absorvâncias medidas são diretamente proporcionais ao número de células, a taxa de adesão define a fração de células que conseguiu aderir ao substrato e permanecer viável. A proliferação expressa o perfil de crescimento das células.

A adesão foi calculada através da razão entre os valores medidos para os poços com as membranas, e os valores obtidos pelo controlo de células, para o qual se considerou uma adesão de 100%. Analogamente, para a determinação da proliferação, cada membrana foi normalizada relativamente ao controlo de células do primeiro dia. A tabela 4.6 contém a adesão celular relativa, e a Figura 4.17 ilustra a evolução da população durante os 14 dias de cultura. Estes valores resultam da média aritmética ponderada dos replicados biológicos, aplicada sobre a média aritmética dos replicados técnicos. A incerteza associada aos replicados biológicos foi determinada pelo desvio-padrão da média ponderada, e a incerteza dos replicados técnicos foi calculada pela lei da propagação das incertezas.

Como é possível observar pela Tabela 4.6, as células aderiram em todas as membranas, mas em geral a adesão revelou-se relativamente baixa comparativamente com o controlo de células. A membrana de PCL apresentou uma adesão de 54%. Para membranas semelhantes, PCL a 20% em AA, outros autores chegaram a resultados idênticos [98, 100]. Em relação às membranas com os grãos de CS, obtiveram-se adesões aproximadas, com taxas compreendidas entre os 32% e os 45%.

Tabela 4.6: Adesão celular relativa determinada para cada membrana, após 24h de cultura. Valores calculados a partir da média ponderada das adesões celulares obtidas em três ensaios de cultura. Todos os valores estão normalizados ao controlo de células.

Membranas	Adesão Celular Relativa
PCL	$0,56 \pm 0,11$
PCL+CS200-150	$0,35 \pm 0,09$
PCL+CS150-100	$0,39 \pm 0,09$
PCL+CS100-50	$0,38 \pm 0,09$
PCL+CS50-0	$0,36 \pm 0,10$
PCL+CS1:0,5	$0,47 \pm 0,09$
PCL+CS1:1	$0,42 \pm 0,10$
PCL+CS1:2	$0,38 \pm 0,08$
PCL+CS1:3	$0,37 \pm 0,09$
Controlo de Células	$1,00 \pm 0,08$

É de notar que a adesão das células à membrana de PCL, é superior à das restantes membranas sendo a diferença estatisticamente significativa. Na verdade, alguns estudos verificaram uma fraca adesão e proliferação das células em matrizes de CS [100, 106], podendo este ser um potencial motivo para as membranas com os grãos de CS apresentarem valores de adesão mais baixos. Aliás, de todas as membranas com CS, a membrana com menor quantidade de grãos, a PCL+CS1:0,5, é a que tem uma adesão celular (47%) mais próxima da membrana de PCL. Este aspeto possivelmente sugere um grau de semelhança entre estas estruturas. Outro facto que pode contribuir para as células aderirem preferencialmente nestas membranas relaciona-se com a organização espacial da estrutura. Christopher S. Chen *et al.* verificaram que a existência de múltiplos pontos de ancoragem da célula à fibronectina em vários locais separados, ou seja, o espalhamento de uma célula na matriz, tem um impacto substancialmente elevado na sobrevivência da célula [109]. É neste sentido que a membrana de PCL à partida apresenta uma distribuição espacial mais favorável que as restantes membranas, uma vez que a presença dos grãos ao expandir a estrutura pode dificultar a adesão das células.

Em relação ao crescimento celular, em todas as membranas houve proliferação, mas encontram-se valores inferiores ao controlo de células, sendo a PCL a que possui valores mais altos, seguida da PCL+CS1:0,5, tal como na adesão celular. O perfil de proliferação celular não varia muito para as diferentes membranas com CS. A população vai aumentando até ao 10º dia de cultura, e a partir deste tende a atingir um estado estacionário. Há, porém, um declínio para as membranas que alteram a proporção de grãos, exceto a PCL+CS1:0,5. Este acontecimento pode estar relacionado com a questão de a organização espacial das fibras contribuir para a sobrevivência das células, como referido anteriormente. Fora as membranas PCL+CS1:1, PCL+CS1:2 e PCL+CS1:3, o ritmo de crescimento da PCL acompanha o controlo de células, mas nas demais membranas com grãos, observa-se uma taxa de proliferação mais lenta.

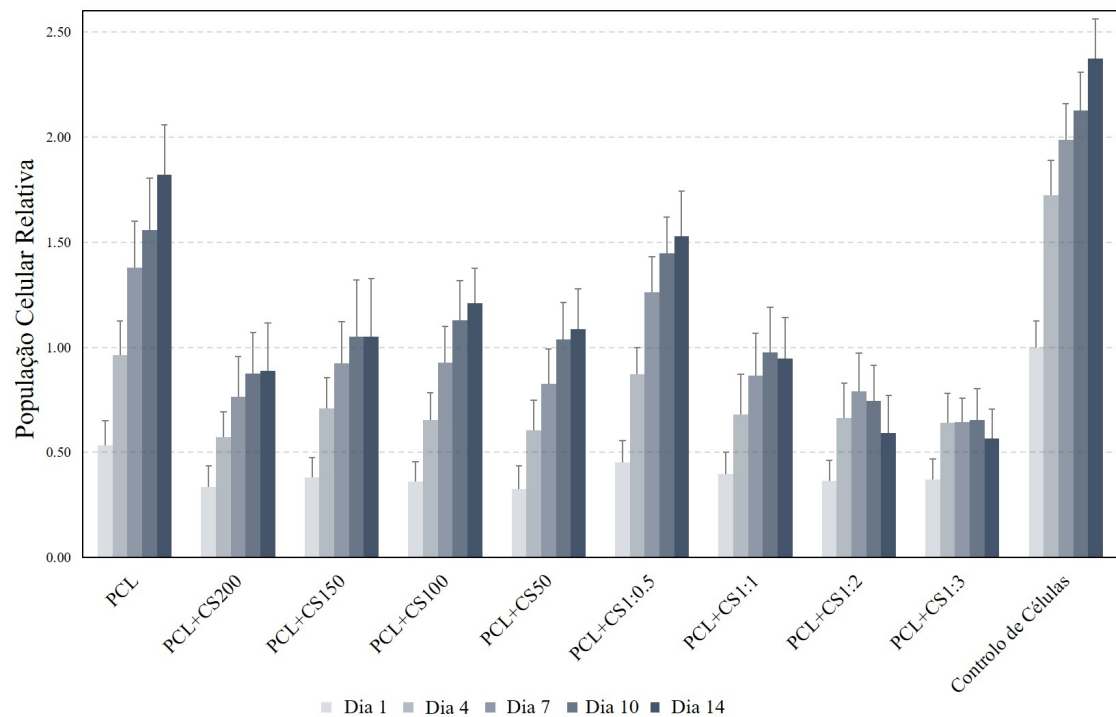


Figura 4.17: Representação da população relativa das células HFFF2 nas diferentes membranas, em função do tempo de cultura. Valores calculados a partir da média ponderada das populações celulares obtidas em três ensaios de cultura. Todos os valores estão normalizados ao controlo de células do 1º dia.

De modo geral, é possível concluir que a introdução dos grãos de CS nas membranas não beneficiou a viabilidade celular, inclusive, nem mesmo a alteração da quantidade e proporção dos mesmos provocou diferentes resultados no comportamento das células.

A significância estatística das diferenças entre os resultados da membrana de PCL e de PCL+CS1:0,5 foi avaliada utilizando o teste-t de Student, e apresenta-se na tabela seguinte.

Tabela 4.7: Resultados da significância estatística para as membranas de PCL e de PCL+CS1:0,5. Comparação entre estas membranas para os valores de adesão (a), e para o último dia de proliferação (b). Considerou-se valores de $p < 0,05$ com diferença estatisticamente significativa.

(a) Dia 1			(b) Dia 14		
Membranas	PCL	PCL+CS 1:0,5	Membranas	PCL	PCL+CS 1:0,5
PCL+CS200-150	<0,0001	<0,001	PCL+CS200-150	<0,0001	0,017
PCL+CS150-100	<0,0001	<0,001	PCL+CS150-100	<0,0001	<0,001
PCL+CS100-50	<0,0001	<0,001	PCL+CS100-50	<0,0001	<0,001
PCL+CS50-0	<0,0001	<0,001	PCL+CS50-0	<0,0001	<0,001
PCL+CS1:0,5	<0,0001	-	PCL+CS1:0,5	<0,0001	-
PCL+CS1:1	<0,0001	0,006	PCL+CS1:1	<0,0001	<0,0001
PCL+CS1:2	<0,0001	<0,001	PCL+CS1:2	<0,0001	<0,0001
PCL+CS1:3	<0,0001	<0,001	PCL+CS1:3	<0,0001	<0,0001
Controlo	<0,0001	<0,001	Controlo	<0,001	<0,0001

4.2.2 Morfologia Celular

De maneira a conseguir perceber melhor a interação das células com as membranas, as amostras das culturas celulares foram analisadas microscopicamente. Esta etapa consistiu na observação das mesmas por MEV, e por microscopia de fluorescência de marcações com DAPI e calceína.

A Figura 4.18 apresenta algumas imagens de MEV representativas das células aderidas a uma membrana apenas de PCL e a uma membrana de PCL com CS. Conforme ilustrado por estas imagens, as células aderem às fibras e adotam uma morfologia distendida, típica do fenótipo normal dos fibroblastos. Aparentemente não existe diferença morfológica entre as células cultivadas sobre a membrana de PCL, e sobre as membranas com os grãos de CS.

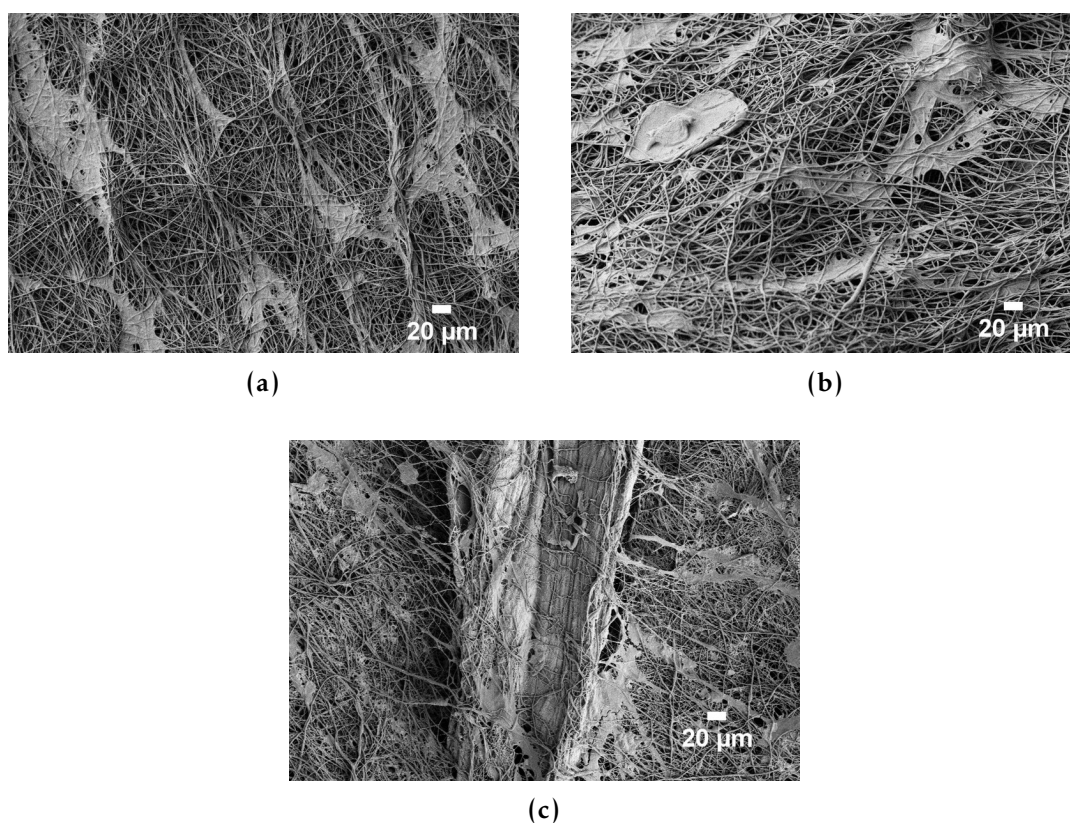


Figura 4.18: Imagens de MEV das células HFFF2 aderidas às membranas produzidas. Membrana: (a) PCL; (b) PCL+CS100-50 e (c) PCL+CS1:0,5. Amostras fixas com PFA e lavadas com água ultrapura após 7 dias de cultura. (Ampliação 200x).

A marcação dos núcleos das células com DAPI, permitiu dar uma melhor percepção da densidade celular à superfície das membranas em análises preliminares. Tal como ilustrado nas imagens da Figura 4.19 é visível a presença dos grãos de CS dada a sua autofluorescência, o que não acontece com as fibras de PCL que não se veem. Os núcleos das células podem ser reconhecidos pelos pontos pequenos e brilhantes.

Comparando qualitativamente as diferentes membranas constata-se que a PCL apresenta mais núcleos do que as membranas com os grãos de CS. Esta observação vai de encontro aos dados da viabilidade celular discutidos anteriormente. Relativamente aos diferentes dias de cultura, 1º, 7º e 14º, a diferença a nível da densidade celular é mais perceptível para a PCL, ainda assim pouco evidente. No entanto, é de notar que a autofluorescência do CS cria um ruído de fundo que dificulta a deteção de células.

Ainda de acordo com as imagens de DAPI, importa referir que ao contrário da membrana de PCL, nas membranas com CS há diferentes planos de focagem de células. Este aspeto poderá correlacionar-se com uma possível infiltração ou então, com a própria rugosidade da superfície atribuída pelos grãos.

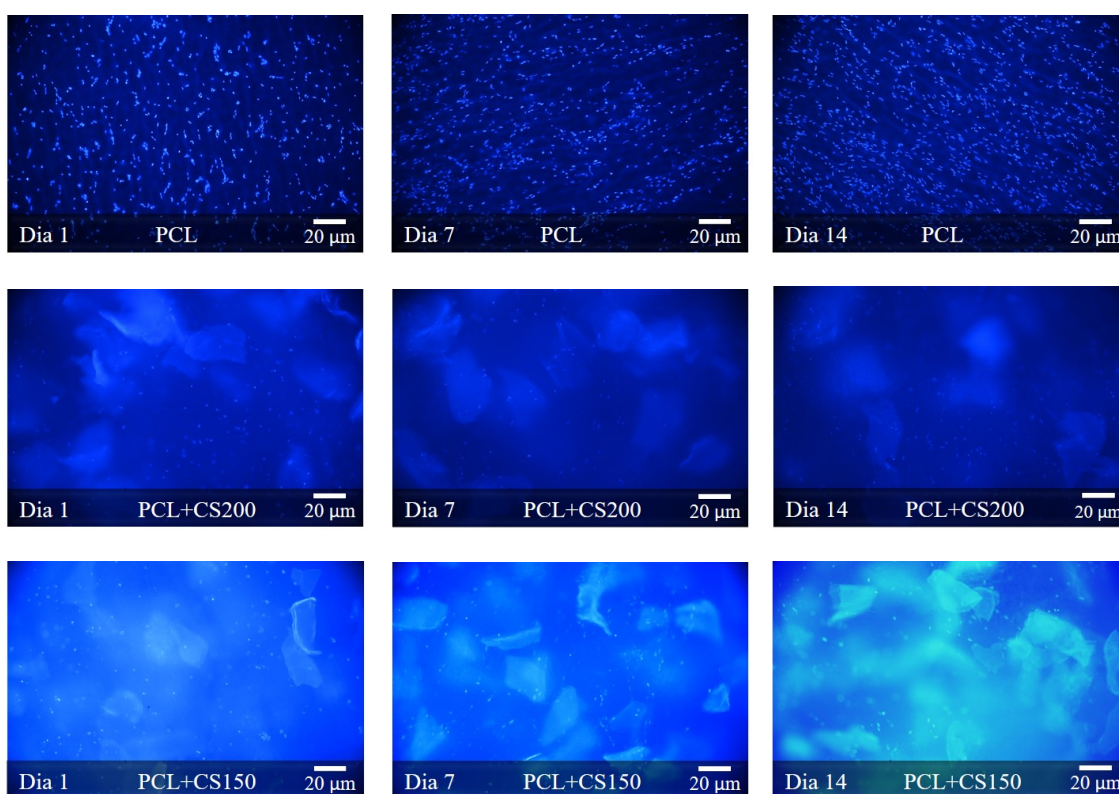


Figura 4.19: Imagens de microscopia de fluorescência da superfície das membranas com células HFFF2 marcadas com DAPI, para diferentes tempos de cultura. Membrana de PCL, PCL+CS200-150 e PCL+CS150-100 nos dias 1, 7 e 14 de cultura. (Ampliação 100x).

O registo das mesmas amostras, mas relativamente à face de baixo encontra-se na Figura 4.20. Destas imagens não se consegue visualizar nenhum núcleo, tanto para PCL como para as amostras com os grãos. Esta ausência de núcleos, é sinal de que as células não conseguiram atravessar a estrutura das membranas por completo. No entanto, embora não se tenha conseguido encontrar núcleos, esta interpretação, por si só, não exclui a possibilidade de as células invadirem até uma determinada profundidade menor.

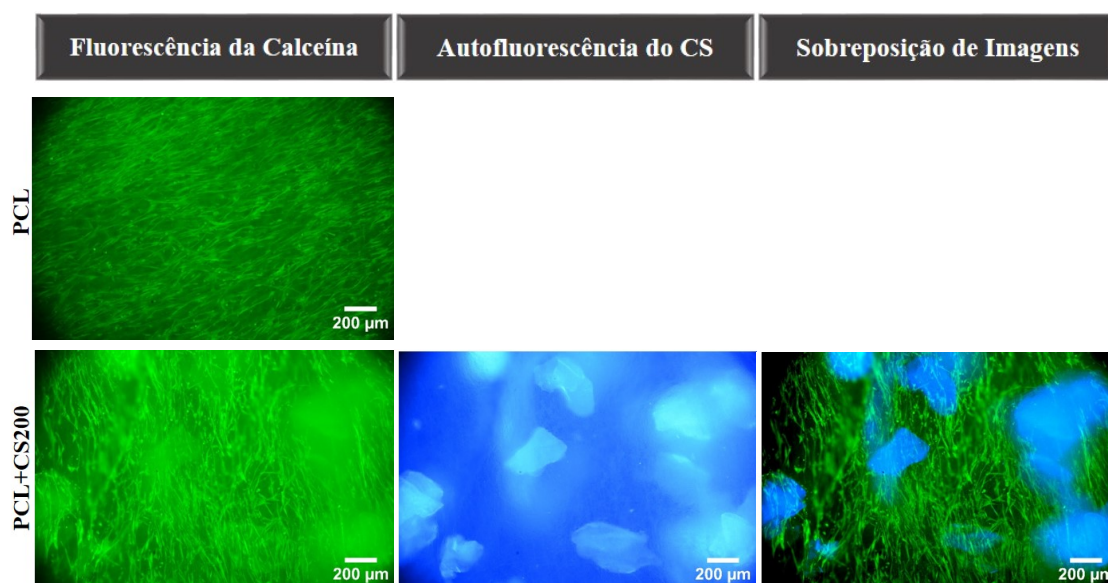


Figura 4.20: Imagens de microscopia de fluorescência da face de baixo das membranas com células HFFF2 marcadas com DAPI. Membrana de PCL, PCL+CS200-150 e PCL+CS150-100 no 14º dia de cultura. (Ampliação 100x).

Recorreu-se também à marcação com a calceína, de modo a tornar mais clara a detecção de células pela estrutura, e a morfologia das mesmas. Ao fim do 15º dia de uma cultura preparada com 4×10^4 células/cm², as amostras foram marcadas com calceína. A Figura 4.20 mostra: (i) imagens de fluorescência da calceína, capturadas em zonas aleatórias, (ii) imagens de autofluorescência dos grãos de CS, captadas na mesma região, e (iii) imagens resultantes da sobreposição de ambas. As células correspondem à coloração verde brilhante e as outras estruturas fluorescentes, aos grãos.

Atendendo à morfologia das células, estas adotam na maioria uma forma alongada. No entanto, algumas membranas com CS, nomeadamente a PCL+CS1:3, exibiram uma alteração redonda na morfologia, característica de células inviáveis. Esta observação está coerente com os resultados da viabilidade celular, na medida em que esta membrana revelou os valores mais baixos de proliferação. Estes resultados, mais uma vez, indicam a dificuldade das células sobreviverem nas membranas com os grãos de CS.

Ainda observando as imagens da calceína, é possível identificar membranas densamente povoadas por células à superfície. Acontece que este não seria o comportamento esperado para matrizes com poros adequados à infiltração celular.



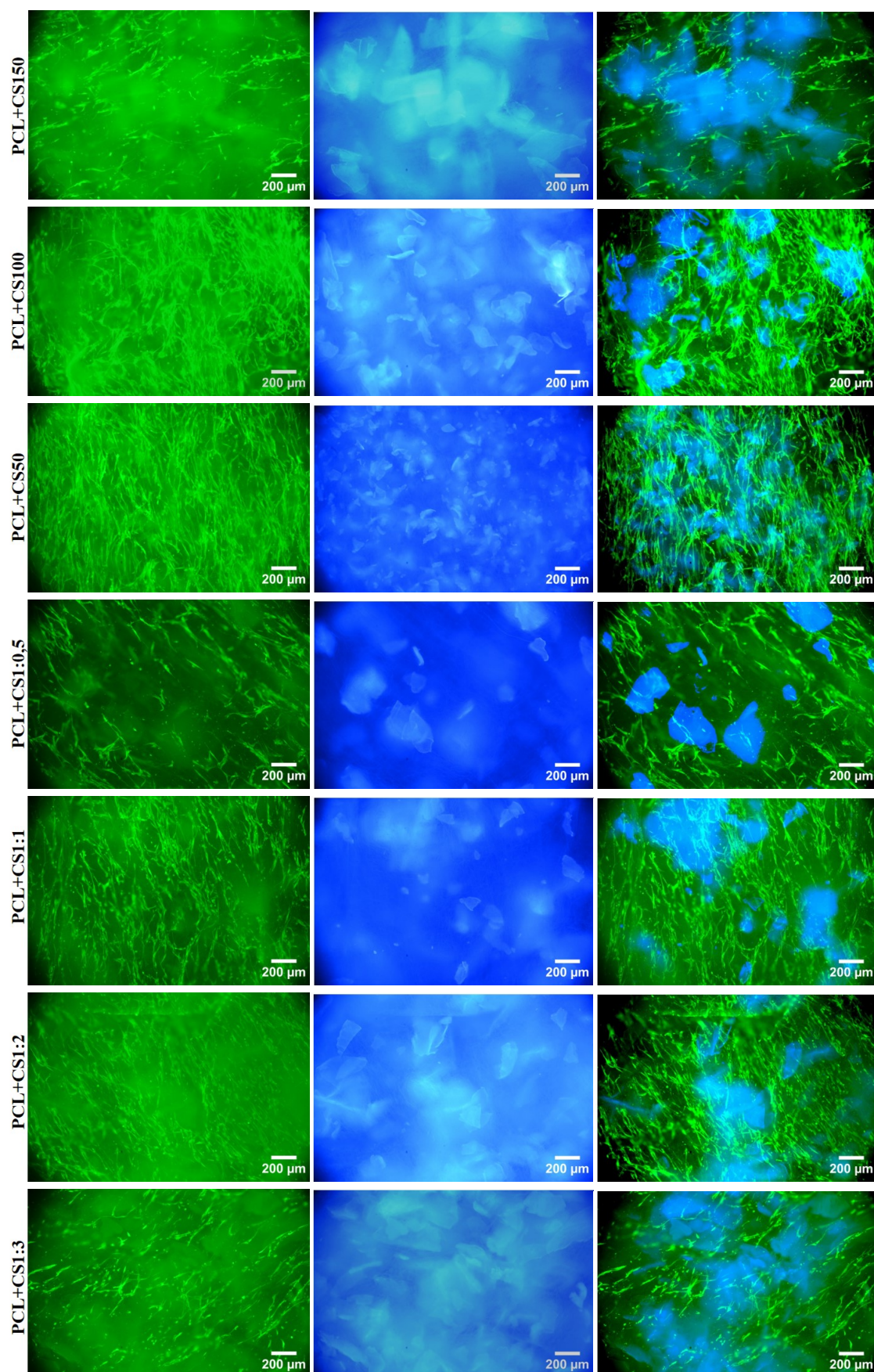


Figura 4.20: Imagens de microscopia de fluorescência da superfície das membranas com células HFFF2 marcadas com calceína. Foram captadas imagens para todas as diferentes membranas produzidas, tendo sido processadas no ImageJ. (Ampliação 100x). 66

4.2.3 Infiltração Celular

Através da aplicação das técnicas histológicas nas diferentes membranas cultivadas com HFFF2, pretende-se analisar a posição dos núcleos no interior das estruturas. Como tal, as amostras foram congeladas, cortadas em secções transversais, e marcadas com DAPI.

Antes de se adicionar o marcador de núcleos, as amostras foram lavadas com água ultrapura para retirar o meio de montagem OCT. Durante este processo os cortes de PCL soltaram-se da lâmina, pelo que não foi possível a observação destas amostras. Os tecidos biológicos têm uma composição rica em macromoléculas polares, permitindo que as amostras cortadas adiram à lâmina carregada positivamente. No entanto, uma vez que a PCL é um polímero predominantemente apolar, não haverá interação electrostática, ao contrário das restantes membranas que contêm o CS, um biomaterial polar. Relativamente às restantes amostras deparou-se com um arraste do material durante o corte dos blocos de gelo, pelo que os cortes ficaram muito deformados e desfeitos. Na Figura 4.21 é possível observar algumas imagens dos cortes em melhor estado.

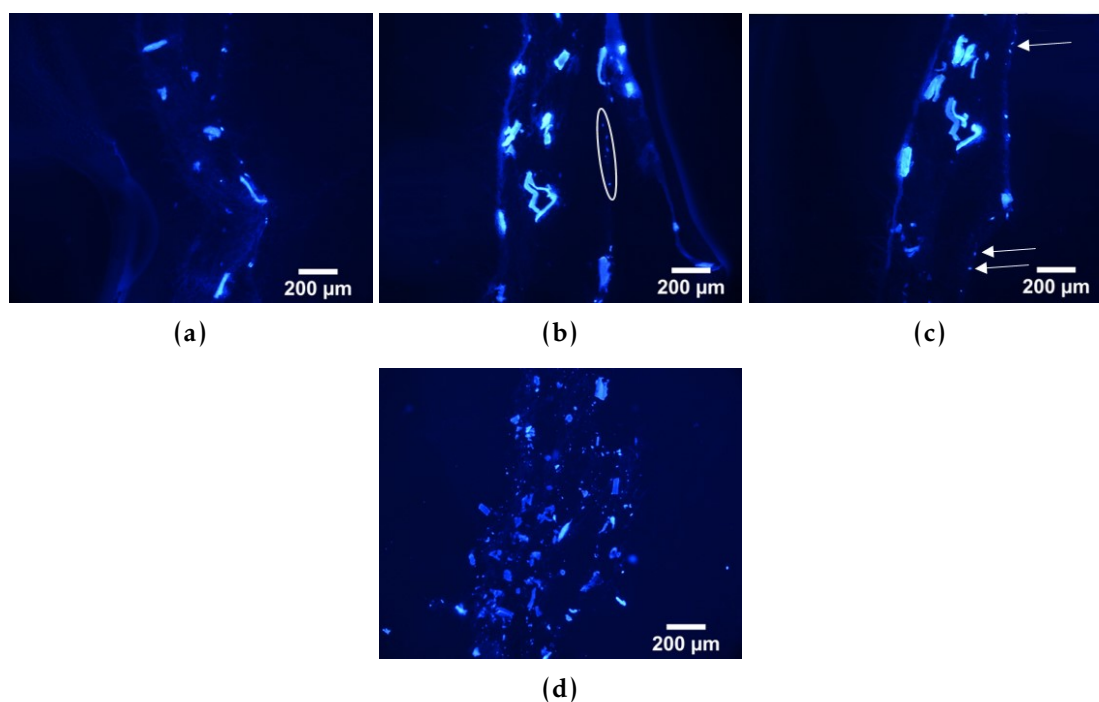
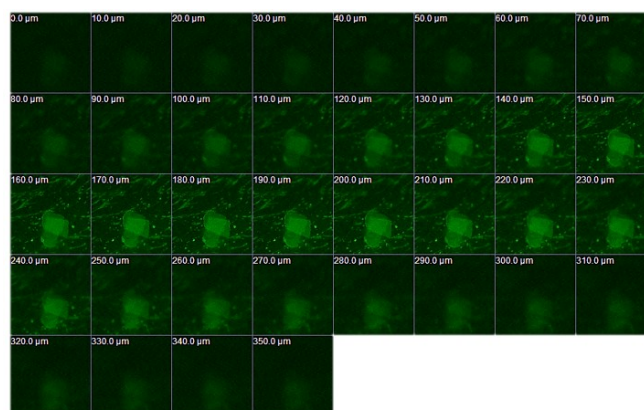


Figura 4.21: Imagens de microscopia de fluorescência de marcação com DAPI dos cortes histológicos das membranas semeadas com HFFF2, ao fim de 14 dias de cultura. Estes cortes correspondem à membrana de PCL+CS100-50 (a-c) e à membrana de PCL+CS50-0 (d), e têm uma espessura de 30 µm. A face inferior da membrana corresponde ao lado esquerdo, e a face de cima ao lado direito. (Ampliação 100x).

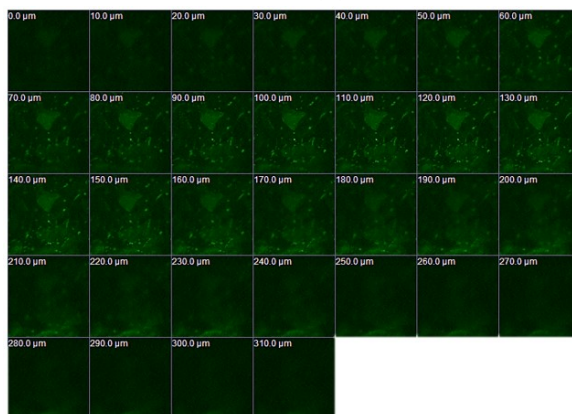
Nestas imagens o corte encontra-se na vertical, sendo que o lado esquerdo corresponde à parte de baixo da membrana, e o lado direito à parte de cima, onde foram semeadas as células. Os cortes apresentam-se encurvados e esburacados, o que pode induzir falsos-positivos, ou seja, células que se encontrem no meio do corte podem não resultar da sua

migração, mas sim da manipulação da estrutura aquando do seu corte. Para além disso, a autofluorescência do CS dificulta a distinção entre um núcleo e um grão, principalmente quando se trata do tamanho mais pequeno de grão, como é o caso da membrana PCL+CS50-0 (Figura 4.21d). À parte destes aspetos, conseguiram-se identificar algumas células, embora elas pareçam encontrar-se essencialmente à superfície, tal como apontado nas imagens.

Outra forma de analisar a infiltração celular é através da observação por microscopia confocal. Ao fim de 20 dias de cultura, amostras marcadas com calceína foram analisadas quanto à invasão celular recorrendo ao varrimento em profundidade. Nas imagens de microscopia confocal as células e grãos detetados aparecem na mesma posição ao longo dos vários planos, ou seja, à medida que a amostra é percorrida em profundidade, no eixo Z, observa-se sempre o mesmo retrato (Figura 4.22). De acordo com estas imagens não foi encontrado nenhum sinal de migração das células para o interior das matrizes. Verificou-se ainda que também não foram observados grãos de CS para além do mesmo plano. Tendo em conta que o processo de deposição é contínuo, os grãos estarão seguramente distribuídos por toda a estrutura. O facto de estes não terem autofluorescência ao longo do corte em profundidade leva a crer que não se consegue aceder ao interior destas amostras.



(a)



(b)

Figura 4.22: Imagens de microscopia confocal de varrimento a laser de amostras de PCL+CS, após 20 dias de cultura de HFFF2 marcadas com calceína. (a) Membrana de PCL+CS1:1, e (b) de PCL+CS1:3.

CONCLUSÃO

A construção de estruturas tridimensionais que suportam o metabolismo celular é uma abordagem fortemente utilizada na regeneração de tecidos. A eletrofiação, fiação assistida por um campo elétrico, é umas das técnicas mais usadas para este fim, por produzir membranas semelhantes à organização da MEC. Contudo, tem a desvantagem da dimensão reduzida dos poros, limitando a invasão das células para o interior da estrutura. Neste cenário, o presente trabalho visou analisar a infiltração de células em membranas fibrosas com poros expandidos. A estratégia adotada consistiu em incorporar grãos de CS numa membrana de PCL, pela eletrofiação simultânea de duas soluções poliméricas. Uma destas destina-se a mimetizar a estrutura fibrilar da MEC do tecido conjuntivo da derme, e a outra tem o propósito de aumentar o tamanho de poro. Desta forma pretendem obter-se membranas capazes de atuar como um substituto de pele.

5.1 Conclusões gerais

Face ao objetivo estipulado, foram produzidas membranas de PCL, um poliéster biodegradável, com micropartículas de CS, um polissacárido que acelera a regeneração de feridas, sendo estas transportadas por uma solução de PEO, um poliéster solúvel em água. Com as várias membranas de PCL+PEO+CS pretendia-se sondar qual a concentração e o tamanho de grãos favorável à infiltração celular.

Numa fase inicial foram ajustadas as condições experimentais do processo de coeletrofiação. A análise morfológica mostrou os grãos de CS envoltos nas fibras, revelando a incorporação destes com sucesso. Quanto às fibras de PCL detetaram-se irregularidades que levantaram suspeitas de degradação do polímero pelo solvente. No entanto, os resultados do módulo de Young e da taxa de adesão e proliferação celular mantiveram-se equiparáveis aos valores mencionados na literatura, pelo que este fenómeno não parece

ter afetado as propriedades mecânicas e biológicas da membrana. As imagens de microscopia permitiram ainda confirmar a variação da granulometria e da proporção de PCL:CS. Porém, no que toca ao efeito das fibras de PEO hidratadas, morfologicamente não se verificou uma diminuição na porosidade da estrutura.

Os ensaios de tração permitiram observar que o aumento do tamanho dos grãos de CS não deu origem a diferenças no módulos de Young, mas quanto à variação da proporção de PCL:CS observou-se uma ligeira diminuição do módulo de Young, para membranas com uma maior quantidade de CS. Verificou-se ainda que a membrana de PCL apresenta melhores propriedades mecânicas do que as membranas com os grãos de CS.

Para determinar o tamanho médio de poro pensou-se em adotar o método do ponto de bolha. O sistema construído é constituído por um sensor de caudal e um de pressão, que permitem a recolha dos respetivos valores à medida que o ar comprimido vai empurrando o líquido embebido numa amostra porosa, provocando a abertura dos poros. Os primeiros testes, realizados com filtros, originaram curvas idênticas ao comportamento teórico das amostras submetidas a este ensaio. Contudo, problemas associados a quedas abruptas da pressão acabam por interromper o ensaio e conduzir a valores fora da linha de seguimento, gerando assim resultados imprecisos, de difícil reprodutibilidade e diferentes do esperado. Nestas condições, o sistema de montagem do método do ponto de bolha não se encontrou apto para as medições do tamanho médio de poro das membranas produzidas.

A análise da permeabilidade ao vapor de água mostrou que as membranas permitem a passagem do vapor de água para o ambiente externo. Estes ensaios baseiam-se na determinação gravimétrica da taxa de transmissão de vapor de água, sendo esta propriedade importante por se tratar de uma das principais funções desempenhada pela pele.

Com o intuito de analisar a infiltração celular, procedeu-se à cultura de fibroblastos de pele humana sobre as diferentes membranas. Os ensaios de viabilidade celular manifestaram uma fraca adesão e proliferação das células sobre as membranas com os grãos, possivelmente devido à organização espacial pouco favorável aos pontos de ancoragem. Recorrendo a vários métodos, procurou-se descobrir se as células invadiam o interior da membrana. Primeiramente as amostras de membranas com células, foram marcadas com DAPI e calcéina, tendo-se observado muitas células à superfície. De seguida foi adotada a técnica histológica, porém a deformação dos cortes e a presença dos grãos de CS tornou difícil a visualização nítida das células. Uma outra tentativa foi a observação por microscopia confocal, mas esta também não cedeu informação útil do interior da membrana.

No geral, toda a análise da caracterização física e biológica, demonstrou um comportamento semelhante entre as membranas com diferentes granulometrias e proporções, querendo isto dizer, que estas variações não são um fator determinante. Ainda que as técnicas de análise da infiltração celular se tenham revelado pouco rigorosas, não foram identificadas evidências de invasão das células para o interior das matrizes. À parte disto, os resultados obtidos com os ensaios mecânicos e permeabilidade ao vapor de água verificaram-se compatíveis com a literatura no que diz respeito à pele, sendo este um indício da aptidão destas membranas em integrar um substituto cutâneo.

Em suma, o estudo realizado com as membranas de PCL+PEO+CS contribuiu com resultados úteis para trabalhos futuros que procurem superar o desafio da fraca infiltração celular inerente a uma matriz de fibras produzida por eletrofiação.

5.2 Trabalho futuro

Futuramente, de modo a promover a adesão das células seria uma boa opção introduzir um polímero natural na solução de PCL, como por exemplo gelatina, de porco, de bovino ou de peixe.

Em função dos resultados obtidos com o método do ponto de bolha, recomenda-se a utilização de um caudalímetro com uma maior gama de leitura, e ainda a recolha automática dos valores de pressão e de caudal. Antes de se prosseguir para os ensaios com as membranas, dever-se-iam realizar ensaios com amostras de diferentes filtros, e posteriormente comparar com os resultados obtidos pelos ensaios de porosimetria por infiltração de mercúrio, para aferir a exatidão do sistema.

Na tentativa de aumentar o tamanho de poro das membranas, visto que não se observaram sinais de infiltração celular, sugere-se a adição de uma maior quantidade de grãos na solução de PEO+CS. As limitações do processo de eletrofiação desta solução exigiram uma concentração máxima de 8% de CS, tendo este valor sido definido utilizando grãos de [200-50] μm . No entanto, usando apenas grãos mais pequenos é possível ultrapassar a quantidade máxima de grãos permitida, uma vez que nestas condições já não ocorre o entupimento da solução. Assim sendo, propõe-se a produção de novas membranas com base numa maior quantidade de grãos de menor tamanho. Seguindo esta versão de membranas de PCL+PEO+CS, em última instância foi produzida uma membrana com grãos de CS de [100-0] μm a 10%. A observação ao microscópio eletrónico permitiu verificar uma melhoria evidente na porosidade da superfície, comparativamente às imagens de MEV das membranas de CS “antigas”. Mais detalhes sobre este resultado encontram-se no anexo IV.

Em relação à análise da infiltração celular, há necessidade em otimizar os protocolos de histologia, quanto à secção das amostras congeladas, e quanto à deteção das células. Uma vez que os cortes são muito finos, devem ser feitas culturas com uma maior densidade de células e deixar a decorrer durante mais tempo. A fim de facilitar a distinção microscópica entre as células e os grãos, seria melhor optar por usar o corante da hematoxilina-eosina em detrimento do DAPI.

Para completar este estudo seria ainda interessante realizar alguns ensaios adicionais à caracterização das membranas. O CS é conhecido por absorver água, pelo que seria importante determinar o grau de inchamento dos grãos. Uma análise que permitisse confirmar a remoção das fibras de PEO também seria útil, como por exemplo utilizando um corante fluorescente durante o processo de fiação, e observando microscopicamente a ausência da coloração destas após o processo de lavagem. Mediante o meio aquoso a que

as membranas são submetidas nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, torna-se também importante a realização de novos testes mecânicos com as amostras embebidas em água, para perceber de que forma as estruturas ficam comprometidas quando sujeitas à remoção do PEO e, quanto à possível capacidade de as membranas incharem com os grãos de CS.

Atendendo a que o CS, na sua forma de grão, atua como apoio na disposição das fibras, seria ainda relevante analisar se a degradação deste biomaterial leva à diminuição do tamanho dos poros e por sua vez ao colapso precoce da estrutura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] K. Vig, A. Chaudhari, S. Tripathi, S. Dixit, R. Sahu, S. Pillai, V. Dennis e S. Singh. “Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering”. Em: *International Journal of Molecular Sciences* 18.4 (2017), p. 789. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms18040789.
- [2] L. P. Kamolz, D. B. Lumenta, H. B. Kitzinger e M. Frey. “Tissue engineering for cutaneous wounds: an overview of current standards and possibilities”. Em: *European Surgery* 40.1 (2008), pp. 19–26. ISSN: 1682-8631. DOI: 10.1007/s10353-008-0380-6.
- [3] World Health Organization. *Burns*. 2018. URL: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/burns> (acedido em 14/08/2018).
- [4] S. Othman Al Shlash, J. Omran Al Madani, J. Ismail El Deib, F. Suliman Alsubhi, S. Saud Al Saifi, A. Mohammed Adel Helmi, S. Khalaf Al-Mutairi e J. Akhtar Khurram. “Demographic characteristics and outcome of burn patients requiring skin grafts: a tertiary hospital experience”. Em: *Int J Burn Trauma* 6.2 (2016), pp. 30–36.
- [5] S. Khorshidi, A. Solouk, H. Mirzadeh, S. Mazinani, J. M. Lagaron, S. Sharifi e S. Ramakrishna. “A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications”. Em: *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 10.9 (2016), pp. 715–738. ISSN: 19326254. DOI: 10.1002/term.1978.
- [6] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa e D. S. Kumar. “Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review”. Em: *International Journal of Polymer Science* 2011.ii (2011), pp. 1–19. ISSN: 1687-9422. DOI: 10.1155/2011/290602.
- [7] R. D. Sontheimer. “Skin Is Not the Largest Organ”. Em: *Journal of Investigative Dermatology* 134.2 (2014), pp. 581–582. ISSN: 0022202X. DOI: 10.1038/jid.2013.335.
- [8] V. Falanga, K. Faria e T. Bollenbach. “Bioengineered Skin Constructs”. Em: *Principles of Tissue Engineering*. 4ª Ed. Elsevier, 2014, pp. 1619–1643. ISBN: 9780123983589. DOI: 10.1016/B978-0-12-398358-9.00077-X.
- [9] M. Albanna e J. H. Holmes IV. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Elsevier, 2016, pp. 265–287. ISBN: 9780128016541. DOI: 10.1016/C2014-0-00850-7.

- [10] Q. Zeng, L. Macri, A. Prasad, R. Clark, D. Zeugolis, C. Hanley, Y. Garcia e A. Pandit. "Skin Tissue Engineering". Em: *Comprehensive Biomaterials*. Vol. 19. 8. Elsevier, 2011, pp. 467–499. ISBN: 19403429. DOI: 10.1016/B978-0-08-055294-1.00186-0.
- [11] L. E. Tracy, R. A. Minasian e E. Caterson. "Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound". Em: *Advances in Wound Care* 5.3 (2016), pp. 119–136. ISSN: 2162-1918. DOI: 10.1089/wound.2014.0561.
- [12] T. Biedermann, S. Boettcher-Haberzeth e E. Reichmann. "Tissue Engineering of Skin for Wound Coverage". Em: *European Journal of Pediatric Surgery* 23.05 (2013), pp. 375–382. ISSN: 0939-7248. DOI: 10.1055/s-0033-1352529.
- [13] R. F. Pereira, C. C. Barrias, P. L. Granja e P. J. Bartolo. "Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair". Em: *Nanomedicine* 8.4 (2013), pp. 603–621. ISSN: 1743-5889. DOI: 10.2217/nnm.13.50.
- [14] W. M. Saltzman. *Tissue engineering: engineering principles for the design of replacement organs and tissues*. 1ª Ed. Oxford University Press, Inc, 2004, p. 544. ISBN: 0198032404.
- [15] D. M. Supp. "Skin substitutes for burn wound healing: current and future approaches". Em: *Expert Review of Dermatology* 6.2 (2011), pp. 217–227. ISSN: 1746-9872. DOI: 10.1586/edm.10.73.
- [16] M. N. Nicholas, M. G. Jeschke e S. Amini-Nik. "Methodologies in creating skin substitutes". Em: *Cellular and Molecular Life Sciences* 73.18 (2016), pp. 3453–3472. ISSN: 1420-682X. DOI: 10.1007/s00018-016-2252-8.
- [17] S. P. Zhong, Y. Z. Zhang e C. T. Lim. "Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction". Em: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2.5 (2010), pp. 510–525. ISSN: 19395116. DOI: 10.1002/wnan.100.
- [18] A. Shafiee e A. Atala. "Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine". Em: *Annual Review of Medicine* 68.1 (2017), pp. 29–40. ISSN: 0066-4219. DOI: 10.1146/annurev-med-102715-092331.
- [19] D. Howard, L. D. Buttery, K. M. Shakesheff e S. J. Roberts. "Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds". Em: *Journal of Anatomy* 213.1 (2008), pp. 66–72. ISSN: 00218782. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x.
- [20] F. J. O'Brien. "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering". Em: *Materials Today* 14.3 (2011), pp. 88–95. ISSN: 13697021. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [21] F. Akter. "Principles of Tissue Engineering". Em: *Tissue Engineering Made Easy*. Elsevier, 2016, pp. 3–16. ISBN: 9780128092286. DOI: 10.1016/B978-0-12-805361-4.00002-3.

- [22] C. P. Barnes, S. A. Sell, E. D. Boland, D. G. Simpson e G. L. Bowlin. “Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds”. Em: *Advanced Drug Delivery Reviews* 59.14 (2007), pp. 1413–1433. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2007.04.022. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X0700186X>.
- [23] A. G. Kanani e S. H. Bahrami. “Review on Electrospun Nanofibres Scaffold and Biomedical Applications”. Em: *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* 24.2 (2010), pp. 93–115.
- [24] S. M. Giannitelli, M. Costantini, F. Basoli, M. Trombetta e A. Rainer. “Electrospinning and microfluidics”. Em: *Electrofluidodynamic Technologies (EFDTs) for Biomaterials and Medical Devices*. Elsevier, 2018, pp. 139–155. ISBN: 9780081017456. DOI: 10.1016/B978-0-08-101745-6.00008-6.
- [25] J. Rnjak-Kovacina e A. S. Weiss. “Increasing the Pore Size of Electrospun Scaffolds”. Em: *Tissue Engineering Part B: Reviews* 17.5 (2011), pp. 365–372. ISSN: 1937-3368. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0235.
- [26] D. Sundaramurthi, U. M. Krishnan e S. Sethuraman. “Electrospun Nanofibers as Scaffolds for Skin Tissue Engineering”. Em: *Polymer Reviews* 54.2 (2014), pp. 348–376. ISSN: 1558-3724. DOI: 10.1080/15583724.2014.881374.
- [27] A. Martins, R. L. Reis e N. M. Neves. “Electrospinning: processing technique for tissue engineering scaffolding”. Em: *International Materials Reviews* 53.5 (2008), pp. 257–274. ISSN: 0950-6608. DOI: 10.1179/174328008X353547.
- [28] R. J. Wade e J. A. Burdick. “Advances in nanofibrous scaffolds for biomedical applications: From electrospinning to self-assembly”. Em: *Nano Today* 9.6 (2014), pp. 722–742. ISSN: 17480132. DOI: 10.1016/j.nantod.2014.10.002.
- [29] N. H. A. Ngadiman, M. Noordin, A. Idris e D. Kurniawan. “A review of evolution of electrospun tissue engineering scaffold: From two dimensions to three dimensions”. Em: *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 231.7 (2017), pp. 597–616. ISSN: 0954-4119. DOI: 10.1177/0954411917699021.
- [30] J. Wu e Y. Hong. “Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration”. Em: *Bioactive Materials* 1.1 (2016), pp. 56–64. ISSN: 2452199X. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2016.07.001.
- [31] R. Bagherzadeh, S. S. Najar, M. Latifi, M. A. Tehran e L. Kong. “A theoretical analysis and prediction of pore size and pore size distribution in electrospun multilayer nanofibrous materials”. Em: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101A.7 (2013), pp. 2107–2117. ISSN: 15493296. DOI: 10.1002/jbm.a.34487.

- [32] J. Rnjak-Kovacina, S. G. Wise, Z. Li, P. K. Maitz, C. J. Young, Y. Wang e A. S. Weiss. “Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering”. Em: *Biomaterials* 32.28 (2011), pp. 6729–6736. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.065.
- [33] D. Li, T. Wu, N. He, J. Wang, W. Chen, L. He, C. Huang, H. A. El-Hamshary, S. S. Al-Deyab, Q. Ke e X. Mo. “Three-dimensional polycaprolactone scaffold via needleless electrospinning promotes cell proliferation and infiltration”. Em: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 121 (2014), pp. 432–443. ISSN: 09277765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.06.034.
- [34] A. Guimarães, A. Martins, E. D. Pinho, S. Faria, R. L. Reis e N. M. Neves. “Solving cell infiltration limitations of electrospun nanofiber meshes for tissue engineering applications”. Em: *Nanomedicine* 5.4 (2010), pp. 539–554. ISSN: 1743-5889. DOI: 10.2217/nnm.10.31.
- [35] P. T. Hwang, K. Murdock, G. C. Alexander, A. D. Salaam, J. I. Ng, D.-J. Lim, D. Dean e H.-W. Jun. “Poly(ϵ -caprolactone)/gelatin composite electrospun scaffolds with porous crater-like structures for tissue engineering”. Em: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 104.4 (2016), pp. 1017–1029. ISSN: 15493296. DOI: 10.1002/jbm.a.35614.
- [36] M. Aghajanpoor, S. Hashemi-Najafabadi, M. Baghaban- Eslaminejad, F. Bagheri, S. Mohammad Mousavi e F. Azam Sayyapour. “The effect of increasing the pore size of nanofibrous scaffolds on the osteogenic cell culture using a combination of sacrificial agent electrospinning and ultrasonication”. Em: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 105.7 (2017), pp. 1887–1899. ISSN: 15493296. DOI: 10.1002/jbm.a.36052.
- [37] X. Zheng, W. Wang, S. Liu, J. Wu, F. Li, L. Cao, X.-d. Liu, X. Mo e C. Fan. “Enhancement of chondrogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells by oriented nanofiber yarn-collagen type I/hyaluronate hybrid”. Em: *Materials Science and Engineering: C* 58 (2016), pp. 1071–1076. ISSN: 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.066.
- [38] Y. Zou, L. Zhang, L. Yang, F. Zhu, M. Ding, F. Lin, Z. Wang e Y. Li. ““Click” chemistry in polymeric scaffolds: Bioactive materials for tissue engineering”. Em: *Journal of Controlled Release* 273.December 2017 (2018), pp. 160–179. ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.01.023.
- [39] L. S. Nair e C. T. Laurencin. “Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery”. Em: *Tissue Engineering I*. Vol. 102. October 2005. Springer Berlin Heidelberg, 2006, pp. 47–90. ISBN: 3540319441. DOI: 10.1007/b137240.

- [40] M. Norouzi, S. M. Boroujeni, N. Omidvarkordshouli e M. Soleimani. “Advances in Skin Regeneration: Application of Electrospun Scaffolds”. Em: *Advanced Healthcare Materials* 4.8 (2015), pp. 1114–1133. ISSN: 21922640. DOI: 10.1002/adhm.201500001.
- [41] V. Guarino, G. Gentile, L. Sorrentino e L. Ambrosio. “Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications”. Em: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017, pp. 1–36. ISBN: 0471440264. DOI: 10.1002/0471440264.pst658. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471440264.pst658>.
- [42] M. Labet e W. Thielemans. “Synthesis of polycaprolactone: a review”. Em: *Chemical Society Reviews* 38.12 (2009), p. 3484. ISSN: 0306-0012. DOI: 10.1039/b820162p.
- [43] D. Mondal, M. Griffith e S. S. Venkatraman. “Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges”. Em: *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 65.5 (2016), pp. 255–265. ISSN: 0091-4037. DOI: 10.1080/00914037.2015.1103241.
- [44] M. A. Woodruff e D. W. Hutmacher. “The return of a forgotten polymer — Polycaprolactone in the 21st century”. Em: *Progress in Polymer Science* 35.10 (2010), pp. 1217–1256. ISSN: 00796700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [45] O. Suwantong. “Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats”. Em: *Polymers for Advanced Technologies* 27.10 (2016), pp. 1264–1273. ISSN: 10427147. DOI: 10.1002/pat.3876.
- [46] J. R. Venugopal, Y. Zhang e S. Ramakrishna. “In Vitro Culture of Human Dermal Fibroblasts on Electrospun Polycaprolactone Collagen Nanofibrous Membrane”. Em: *Artificial Organs* 30.6 (2006), pp. 440–446. ISSN: 0160-564X. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2006.00239.x.
- [47] F. Croisier e C. Jérôme. “Chitosan-based biomaterials for tissue engineering”. Em: *European Polymer Journal* 49.4 (2013), pp. 780–792. ISSN: 00143057. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009.
- [48] S. Islam, M. A. R. Bhuiyan e M. N. Islam. “Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering”. Em: *Journal of Polymers and the Environment* 25.3 (2017), pp. 854–866. ISSN: 1566-2543. DOI: 10.1007/s10924-016-0865-5.
- [49] A. Anitha, S. Sowmya, P. S. Kumar, S. Deepthi, K. Chennazhi, H. Ehrlich, M. Tsurkan e R. Jayakumar. “Chitin and chitosan in selected biomedical applications”. Em: *Progress in Polymer Science* 39.9 (2014), pp. 1644–1667. ISSN: 00796700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008.

- [50] M. Periyah, A. Halim e A. M. Saad. "Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research". Em: *Pharmacognosy Reviews* 10.19 (2016), p. 39. ISSN: 0973-7847. DOI: 10.4103/0973-7847.176545.
- [51] K. Y. Lee, L. Jeong, Y. O. Kang, S. J. Lee e W. H. Park. "Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine". Em: *Advanced Drug Delivery Reviews* 61.12 (2009), pp. 1020–1032. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2009.07.006.
- [52] M. Kazemi Pilehrood, M. Dilamian, M. Mirian, H. Sadeghi-Aliabadi, L. Maleknia, P. Nousiainen e A. Harlin. "Nanofibrous Chitosan-Polyethylene Oxide Engineered Scaffolds: A Comparative Study between Simulated Structural Characteristics and Cells Viability". Em: *BioMed Research International* 2014 (2014), pp. 1–9. ISSN: 2314-6133. DOI: 10.1155/2014/438065.
- [53] M. Hacker e A. Mikos. "Synthetic Polymers". Em: *Principles of Regenerative Medicine*. Second Edi. Elsevier, 2011, pp. 587–622. ISBN: 9780128098806. DOI: 10.1016/B978-0-12-381422-7.10033-1.
- [54] L. Ma, L. Deng e J. Chen. "Applications of poly(ethylene oxide) in controlled release tablet systems: a review". Em: *Drug Development and Industrial Pharmacy* 40.7 (2014), pp. 845–851. ISSN: 0363-9045. DOI: 10.3109/03639045.2013.831438.
- [55] B. Hammouda. "Solvation characteristics of a model water-soluble polymer". Em: *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 44.22 (2006), pp. 3195–3199. ISSN: 0887-6266. DOI: 10.1002/polb.20967.
- [56] S. Dhawan, M. Varma e V. Sinha. "High Molecular Weight Poly(ethylene oxide) – Based Drug Delivery Systems". Em: *Pharm Technol* 29.May (2005), pp. 72–80. ISSN: 15432521.
- [57] C Henriques, R Vidinha, D Botequim, J. P. Borges e J. a.M. C. Silva. "A Systematic Study of Solution and Processing Parameters on Nanofiber Morphology Using a New Electrospinning Apparatus". Em: *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 9.6 (2009), pp. 3535–3545. ISSN: 15334880. DOI: 10.1166/jnn.2009.NS27.
- [58] D. Semnani, E. Naghashzargar, M. Hadjianfar, F. Dehghan Manshadi, S. Mohammadi, S. Karbasi e F. Effaty. "Evaluation of PCL/chitosan electrospun nanofibers for liver tissue engineering". Em: *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 66.3 (2017), pp. 149–157. ISSN: 0091-4037. DOI: 10.1080/00914037.2016.1190931.
- [59] T. Prasad, E. A. Shabeena, D. Vinod, T. V. Kumary e P. R. Anil Kumar. "Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering". Em: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 26.1 (2015), p. 28. ISSN: 0957-4530. DOI: 10.1007/s10856-014-5352-8.

- [60] D. Jhala, H. Rather e R. Vasita. "Polycaprolactone–chitosan nanofibers influence cell morphology to induce early osteogenic differentiation". Em: *Biomaterials Science* 4.11 (2016), pp. 1584–1595. ISSN: 2047-4830. DOI: 10.1039/C6BM00492J.
- [61] S. C. Neves, L. S. Moreira Teixeira, L. Moroni, R. L. Reis, C. A. Van Blitterswijk, N. M. Alves, M. Karperien e J. F. Mano. "Chitosan/Poly(ϵ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair". Em: *Biomaterials* 32.4 (2011), pp. 1068–1079. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.073.
- [62] F. Du, H. Wang, W. Zhao, D. Li, D. Kong, J. Yang e Y. Zhang. "Gradient nanofibrous chitosan/poly ϵ -caprolactone scaffolds as extracellular microenvironments for vascular tissue engineering". Em: *Biomaterials* 33.3 (2012), pp. 762–770. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.037.
- [63] E. Bolaina-Lorenzo, C. Martínez-Ramos, M. Monleón-Pradas, W. Herrera-Kao, J. V. Cauich-Rodríguez e J. M. Cervantes-Uc. "Electrospun polycaprolactone/chitosan scaffolds for nerve tissue engineering: physicochemical characterization and Schwann cell biocompatibility". Em: *Biomedical Materials* 12.1 (2016), p. 015008. ISSN: 1748-605X. DOI: 10.1088/1748-605X/12/1/015008.
- [64] A. R. Sarasam, A. I. Samli, L. Hess, M. A. Ihnat e S. V. Madihally. "Blending Chitosan with Polycaprolactone: Porous Scaffolds and Toxicity". Em: *Macromolecular Bioscience* 7.9–10 (2007), pp. 1160–1167. ISSN: 16165187. DOI: 10.1002/mabi.200700001.
- [65] M. G. Tardajos, G. Cama, M. Dash, L. Misseeuw, T. Gheysens, C. Gorzelanny, T. Coenye e P. Dubruel. "Chitosan functionalized poly- ϵ -caprolactone electrospun fibers and 3D printed scaffolds as antibacterial materials for tissue engineering applications". Em: *Carbohydrate Polymers* 191 (2018), pp. 127–135. ISSN: 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.02.060.
- [66] S. Hong e G. Kim. "Fabrication of electrospun polycaprolactone biocomposites reinforced with chitosan for the proliferation of mesenchymal stem cells". Em: *Carbohydrate Polymers* 83.2 (2011), pp. 940–946. ISSN: 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.09.002.
- [67] Y. Wu, G. Sriram, A. S. Fawzy, J. Y. Fuh, V. Rosa, T. Cao e Y. S. Wong. "Fabrication and evaluation of electrohydrodynamic jet 3D printed polycaprolactone/chitosan cell carriers using human embryonic stem cell-derived fibroblasts". Em: *Journal of Biomaterials Applications* 31.2 (2016), pp. 181–192. ISSN: 0885-3282. DOI: 10.1177/0885328216652537.
- [68] X. Jiang, X. Lu, B. Xiao, Y. Wan e Y. Zhao. "In vitro growth and activity of chondrocytes on three dimensional polycaprolactone/chitosan scaffolds". Em: *Polymers for Advanced Technologies* 23.1 (2012), pp. 99–107. ISSN: 10427147. DOI: 10.1002/pat.1830.

- [69] M. d. S. Fernandes. “Membranas de policaprolactona e quitosano para aplicação estomatológica”. Dissertação apresentada à Universidade NOVA de Lisboa para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Biomédica. Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2011.
- [70] Y. Xu, Y. Zhu, F. Han, C. Luo e C. Wang. “3D Si/C Fiber Paper Electrodes Fabricated Using a Combined Electrospray/Electrospinning Technique for Li-Ion Batteries”. Em: *Advanced Energy Materials* 5.1 (2015), p. 1400753. ISSN: 16146832. DOI: 10.1002/aenm.201400753.
- [71] J. L. Ferreira, S. Gomes, C. Henriques, J. P. Borges e J. C. Silva. “Electrospinning polycaprolactone dissolved in glacial acetic acid: Fiber production, nonwoven characterization, and In Vitro evaluation”. Em: *Journal of Applied Polymer Science* 131.22 (2014), n/a–n/a. ISSN: 00218995. DOI: 10.1002/app.41068.
- [72] Instron Corporation. *Tensile Testing*. URL: <https://www.instron.us/en-us/our-company/library/test-types/tensile-test>. (acedido em 28/01/2019).
- [73] H. Joodaki e M. B. Panzer. “Skin mechanical properties and modeling: A review”. Em: *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 232.4 (2018), pp. 323–343. ISSN: 0954-4119. DOI: 10.1177/0954411918759801.
- [74] H. Lim e S. W. Hoag. “Plasticizer Effects on Physical–Mechanical Properties of Solvent Cast Soluplus® Films”. Em: *AAPS PharmSciTech* 14.3 (2013), pp. 903–910. ISSN: 1530-9932. DOI: 10.1208/s12249-013-9971-z.
- [75] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen e J. E. Lemons. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 3ª Ed. Elsevier, 2004, pp. 55–57. ISBN: 0125824637.
- [76] H.-I. Chang e Y. Wang. “Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds”. Em: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. InTech, 2011. ISBN: 978-953-307-663-8. DOI: 10.5772/21983.
- [77] KSV Instruments. *The Modular CAM 200 – Optical Contact Angle and Surface Tension Meter*. URL: http://www.rheology.cn/company/{_}manage/product/{_}yangben/rheology2008219173135.pdf.
- [78] V. S. Kulkarni e C. Shaw. “Surfactants, Lipids, and Surface Chemistry”. Em: *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*. Elsevier, 2016, pp. 5–19. ISBN: 9780128010242. DOI: 10.1016/B978-0-12-801024-2.00002-9.
- [79] L.-T. Fan, X.-G. Yuan, C.-x. Zhou, A.-W. Zeng, K.-T. Yu, M. Kalbassi e K. Porter. “Contact Angle of Ethanol and n-Propanol Aqueous Solutions on Metal Surfaces”. Em: *Chemical Engineering & Technology* 34.9 (2011), pp. 1535–1542. ISSN: 09307516. DOI: 10.1002/ceat.201000474.

- [80] S. Zhong, Y. Zhang e C. T. Lim. "Fabrication of Large Pores in Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Cellular Infiltration: A Review". Em: *Tissue Engineering Part B: Reviews* 18.2 (2012), pp. 77–87. ISSN: 1937-3368. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0390.
- [81] D. Li, M. W. Frey e Y. L. Joo. "Characterization of nanofibrous membranes with capillary flow porometry". Em: *Journal of Membrane Science* 286.1-2 (2006), pp. 104–114. ISSN: 03767388. DOI: 10.1016/j.memsci.2006.09.020.
- [82] A. Jena e K. Gupta. "Advances in Pore Structure Evaluation by Porometry". Em: *Chemical Engineering & Technology* 33.8 (2010), pp. 1241–1250. ISSN: 09307516. DOI: 10.1002/ceat.201000119.
- [83] I. Wenten, K. Khoiruddin, A. Hakim e N. Himma. "The Bubble Gas Transport Method". Em: *Membrane Characterization*. Elsevier, 2017. Cap. 11, pp. 199–218. ISBN: 9780444637918. DOI: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00011-5.
- [84] Porous Materials. *i Pore*. URL: http://www.pmiapp.com/themes/pmiapp/brochure/iPORE{_}series{_}webview.pdf.
- [85] R. Xu, H. Xia, W. He, Z. Li, J. Zhao, B. Liu, Y. Wang, Q. Lei, Y. Kong, Y. Bai, Z. Yao, R. Yan, H. Li, R. Zhan, S. Yang, G. Luo e J. Wu. "Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement". Em: *Scientific Reports* 6.1 (2016), p. 24596. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep24596.
- [86] R. Machado, A. da Costa, V. Sencadas, C. Garcia-Arévalo, C. M. Costa, J. Padrão, A. Gomes, S. Lanceros-Méndez, J. C. Rodríguez-Cabello e M. Casal. "Electrospun silk-elastin-like fibre mats for tissue engineering applications". Em: *Biomedical Materials* 8.6 (2013), p. 065009. ISSN: 1748-6041. DOI: 10.1088/1748-6041/8/6/065009.
- [87] A. Chakkarapani. "Cells for Tissue Engineering". Em: *Introduction to Tissue Engineering*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. Cap. 2, pp. 40–83. ISBN: 9781412916882. DOI: 10.1002/9781118886410.ch2.
- [88] G. M. Cooper e R. E. Hausman. "An Overview of Cells and Cell Research". Em: *The Cell: A Molecular Approach*. 4ª Ed. Sinauer Associates, Inc., 2006, pp. 33–35.
- [89] S. A. Hudu, A. S. Alsharri, A. Syahida e Z. Sekawi. "Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases". Em: *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 10.3 (2016), DE01–DE05. ISSN: 2249782X. DOI: 10.7860/JCDR/2016/15837.7460.
- [90] B. Q. Huang e E. C. Yeung. "Chemical and Physical Fixation of Cells and Tissues: An Overview". Em: *Plant Microtechniques and Protocols*. Cham: Springer International Publishing, 2015. Cap. 2, pp. 23–43. ISBN: 9783319199443. DOI: 10.1007/978-3-319-19944-3_2.

- [91] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzlla e L. Minor. "Cell Viability Assays". Em: *Assay Guidance Manual* (2016), pp. 1–23. ISSN: 0014-5793. DOI: 10.1016/j.acthis.2012.01.006. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
- [92] D. F. Gilbert e O. Friedrich. *Cell Viability Assays*. Vol. 1601. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Humana Press, 2017, pp. 1–17. ISBN: 978-1-4939-6959-3. DOI: 10.1007/978-1-4939-6960-9.
- [93] Molecular Probes products. *Data Sheet: DAPI Nucleic Acid Stain*. 2006. URL: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp01306.pdf>.
- [94] N. Dias e N. Lima. "A comparative study using a fluorescence-based and a direct-count assay to determine cytotoxicity in *Tetrahymena pyriformis*". Em: *Research in Microbiology* 153.5 (2002), pp. 313–322. ISSN: 09232508. DOI: 10.1016/S0923-2508(02)01326-8.
- [95] L. C. Junqueira e J. Carneiro. "Métodos de Estudo em Histologia". Em: *Histologia Básica - Texto e Atlas*. 12ª Ed. Guanabara, 2013. Cap. 1, pp. 1–20. ISBN: 9788527723114.
- [96] Lei Yu, Yubin Ji, Miao Yu, Shiyong Gao, Xiang Zou e Chenfeng Ji. "Analysis of apoptosis mechanism in SGC-7901 induced by CSBE with flow cytometry and confocal laser scanning technology". Em: *2013 ICME International Conference on Complex Medical Engineering*. IEEE, 2013, pp. 54–58. ISBN: 978-1-4673-2971-2. DOI: 10.1109/ICCME.2013.6548211.
- [97] X. Qin e D. Wu. "Effect of different solvents on poly(caprolactone) (PCL) electrospun nonwoven membranes". Em: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 107.3 (2012), pp. 1007–1013. ISSN: 1388-6150. DOI: 10.1007/s10973-011-1640-4.
- [98] S. Gomes, D. Querido, J. L. Ferreira, J. P. Borges e J. C. Silva. "Using Water to Control Electrospun Polycaprolactone Fibre Morphology for Soft Tissue Engineering". Em: (Submetido para publicação).
- [99] A. Gholipour Kanani e S. H. Bahrami. "Effect of Changing Solvents on Poly(-Caprolactone) Nanofibrous Webs Morphology". Em: *Journal of Nanomaterials* 2011 (2011), pp. 1–10. ISSN: 1687-4110. DOI: 10.1155/2011/724153. URL: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2011/724153/>.
- [100] T. Valente, J. L. Ferreira, C. Henriques, J. P. Borges e J. C. Silva. "Polymer blending or fiber blending: A comparative study using chitosan and poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers". Em: *Journal of Applied Polymer Science* 136.11 (2019), p. 47191. ISSN: 00218995. DOI: 10.1002/app.47191.

- [101] F. H. Silver, J. W. Freeman e D. DeVore. “Viscoelastic properties of human skin and processed dermis”. Em: *Skin Research and Technology* 7.1 (2001), pp. 18–23. ISSN: 0909-752X. DOI: 10.1034/j.1600-0846.2001.007001018.x.
- [102] B. M. Baker, A. O. Gee, R. B. Metter, A. S. Nathan, R. A. Marklein, J. A. Burdick e R. L. Mauck. “The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers”. Em: *Biomaterials* 29.15 (2008), pp. 2348–2358. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.032.
- [103] B. M. Whited, J. R. Whitney, M. C. Hofmann, Y. Xu e M. N. Rylander. “Pre-osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds”. Em: *Biomaterials* 32.9 (2011), pp. 2294–2304. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.003.
- [104] G. Jin, M. P. Prabhakaran, D. Kai, S. K. Annamalai, K. D. Arunachalam e S. Ramakrishna. “Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing”. Em: *Biomaterials* 34.3 (2013), pp. 724–734. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.026.
- [105] K. Lee, B. Lee, C. Kim, H. Kim, K. Kim e C. Nah. “Stress-strain behavior of the electrospun thermoplastic polyurethane elastomer fiber mats”. Em: *Macromolecular Research* 13.5 (2005), pp. 441–445. ISSN: 1598-5032. DOI: 10.1007/BF03218478.
- [106] S. Gomes, G. Rodrigues, G. Martins, M. Roberto, M. Mafra, C. Henriques e J. Silva. “In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study”. Em: *Materials Science and Engineering: C* 46 (2015), pp. 348–358. ISSN: 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2014.10.051.
- [107] J. Gigac, M. Stankovska e M. Fiserova. “Comparison of Capillary Flow Porometry and Mercury Intrusion Porosimetry in Determination Pore Size Distribution of Papers”. Em: *Wood Research* 62.4 (2017), pp. 587–596. ISSN: 1336-4561.
- [108] L.-O. Lamke, G. Nilsson e H. Reithner. “The evaporative water loss from burns and the water-vapour permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns”. Em: *Burns* 3.3 (1977), pp. 159–165. ISSN: 03054179. DOI: 10.1016/0305-4179(77)90004-3.
- [109] C. S. Chen. “Geometric Control of Cell Life and Death”. Em: *Science* 276.5317 (1997), pp. 1425–1428. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.276.5317.1425.

Electrospray DE MICROPARTÍCULAS DE CS

Para se obterem grânulos de quitosano com tamanhos variáveis entre os 200 e 0 μm , de uma forma mais eficaz, foi experimentada a eletropulverização de uma solução de quitosano, para um coletor em banho. Com este método pretende-se gotejar a solução, e a partir da reação química entre o solvente usado e a solução do banho, precipitar o CS.

Começou-se por preparar uma solução de 3% de CS, dissolvido em ácido acético glacial a 4% e em água destilada. Depois de homogeneizada, a solução foi transferida para dentro de uma seringa, colocada numa bomba configurada com um caudal de 2 ml/h. A 23 cm de distância da ponta da seringa posicionou-se uma tina de vidro com uma solução de hidróxido de sódio a 1 M. Foram aplicadas diferentes tensões sobre a solução de modo a analisar a influência no tamanho das micropartículas de CS. A montagem experimental adotada apresenta-se na Figura I.1.

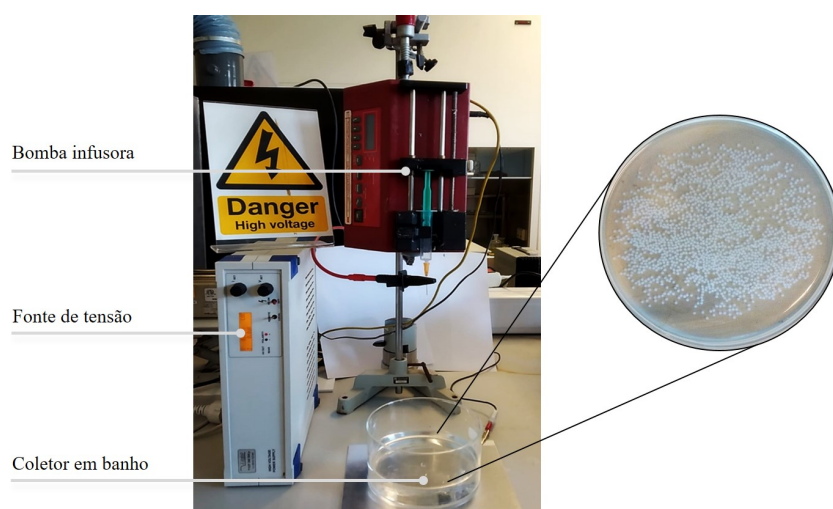


Figura I.1: Configuração experimental adotada no *electrospray* de uma solução de CS para a produção de micropartículas.

Após o processo de pulverização elétrica, as micropartículas de CS formadas dentro do banho foram lavadas com água destilada e deixadas a secar na estufa a 70 °C. Por fim, foram observadas ao microscópio ótico e os diâmetros foram determinados no programa de aquisição de imagens. Algumas das imagens recolhidas para as diferentes tensões, e os respectivos diâmetros apresentam-se nas figuras seguintes.

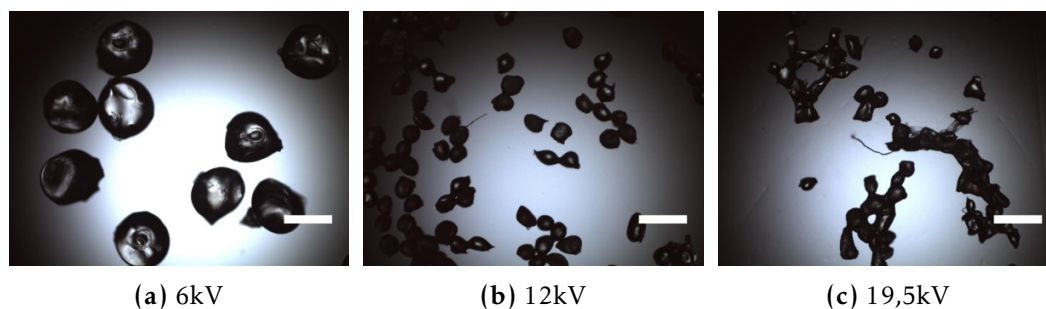


Figura I.2: Imagens de microscopia ótica das micropartículas de CS formadas pelo método de *electrospray*, para diferentes tensões. (Escala = 500 μm .)

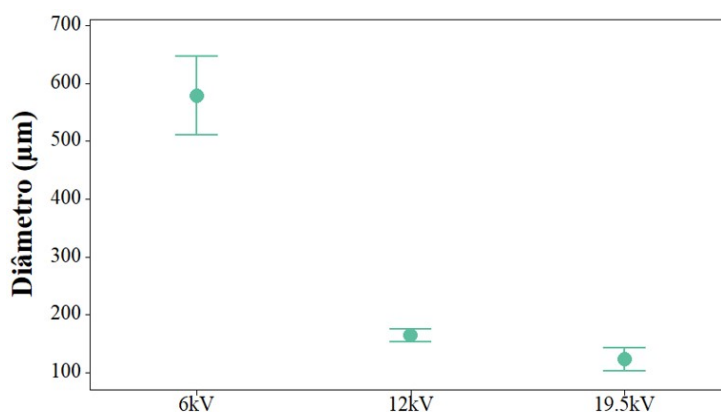


Figura I.3: Representação gráfica dos diâmetros das micropartículas de CS em função da tensão aplicada.

As micropartículas de CS apresentaram uma morfologia esférica, mas revelaram muitos agregados. Os diâmetros obtidos para as diferentes tensões testadas, variam entre os 93 μm e os 643 μm , verificando-se que a maior parte dos tamanhos não se encontram dentro da gama pretendida. Este método é bastante usual na produção e controlo de grânulos de quitosano, no entanto não se encontra aperfeiçoado.



DESENHO TÉCNICO

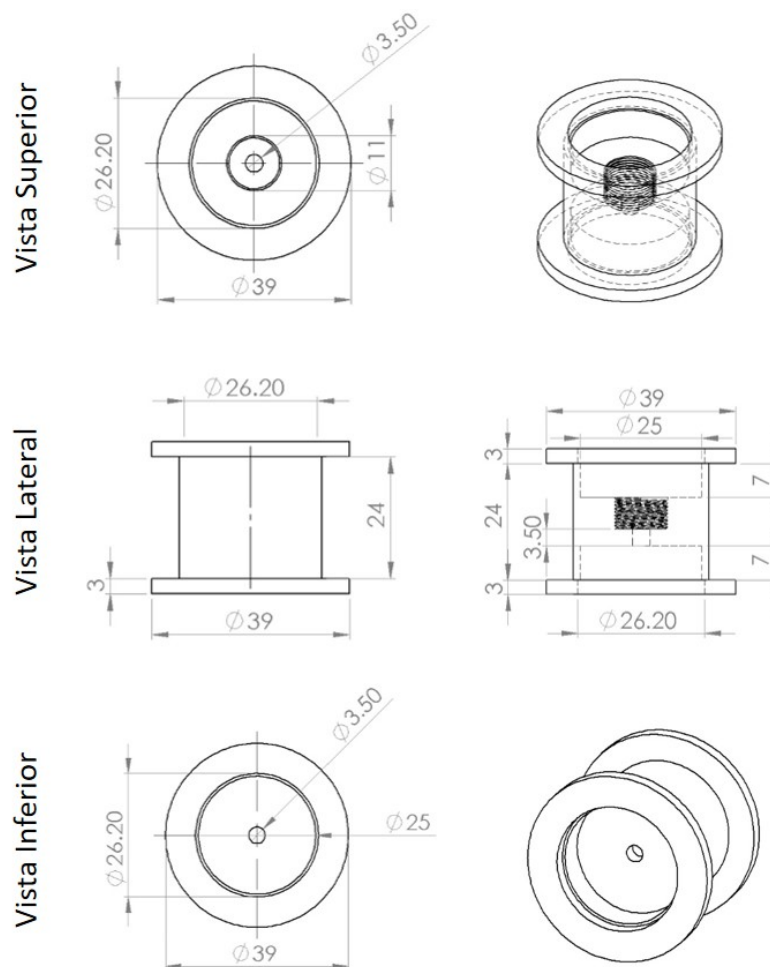


Figura II.1: Desenho técnico das vistas ortográficas da peça de suporte usada nos ensaios do ponto de bolha. Imagens obtidas pelo SolidWorks. (Unidades em milímetros.)



PROTÓCOLOS DE CULTURA DE CÉLULAS

A - Esterilização de membranas

Depois das várias membranas produzidas serem cortadas em forma de disco com 12 mm de diâmetro e separadas do papel de alumínio sob o qual foram depositadas, as amostras foram esterilizadas dentro da câmara de segurança microbiológica, um dia antes da sementeira de células.

- 1) Colocar as amostras dentro de placas de petri de cultura;
- 2) Embeber as amostras em etanol a 70% (v/v), durante cerca de 15 minutos, na câmara de fluxo;
- 3) Aspirar o excesso de etanol com uma pipeta;
- 4) Lavar duas vezes com PBS e uma vez com DMEM completo;
- 5) Montar as amostras nas peças de teflon e colocar nos poços de uma placa de 24;
- 6) Transferir 200 µl de DMEM para cada um dos poços com as peças de teflon.

B - Descongelamento das Células

- 1) Descongelar o criotubo das células crioconservadas a -80 °C, num cristalizador com água destilada previamente aquecida a 37 °C;
- 2) Transferir 1 ml da solução de células do criotubo para um tubo de falcon, e adicionar 4 ml de DMEM completo;
- 3) Centrifugar as células a 100×g por 5 minutos;
- 4) Descartar a fração sobrenadante numa solução de lixívia a 1%, e transferir o grânulo de células (pellet) para um frasco de cultura, T25;
- 5) Diluir o pellet com 4 ml de DMEM completo e ressuspender;
- 6) Colocar o T25 na incubadora de CO₂ a 37 °C.

Após a descongelação das células, elas foram mantidas em cultura até atingir confluência para posterior sementeira de células sobre as amostras esterilizadas. Nesta fase o meio de cultura era renovado de dois em dois dias.

C - Sementeira de Células

A sementeira de células compreende duas etapas, primeiro a tripsinação seguida da contagem de células. Na tripsinação pretende-se que as células aderidas se soltem da parede do frasco, sendo usada uma enzima responsável por cortar as ligações das células ao substrato. Para a contagem de células foi usado um hemocitômetro (Hirschmann), que permitiu estimar o número de células a semear em cada amostra.

Tripsinação:

- 1) Remover o meio de cultura do T25 com uma pipeta de Pasteur;
- 2) Lavar as células com 5 ml de PBS sem cálcio nem magnésio (PBS⁻⁻⁻);
- 3) Pipetar 500 µl de tripsina (TrypLE™) sobre as células, e deixar a incubar durante 6 minutos;
- 4) Confirmar se as células estão em suspensão através do microscópio invertido;
- 5) Adicionar 5 ml de DMEM completo ao T25;
- 6) Transferir a suspensão de células do T25 para um falcon e ressuspender.

Contagem de células:

- 1) Retirar 100 µl da suspensão de células para um eppendorf, adicionar 100 µl de azul tripano, homogeneizar e suspender;
- 2) Pipetar a solução suspensa para as câmaras de contagem do hemocitômetro;
- 3) Contar o número de células viáveis nas grelhas do hemocitômetro, através do microscópio invertido;
- 4) Determinar a concentração celular (número de células/ml), segundo a equação (III.1), e o volume de solução de células que é necessário diluir, para semear a quantidade de células que se pretende.

$$\text{Concentração de células viáveis} = \frac{\text{nº de células viáveis}}{\text{nº de quadrados com } 1\text{mm}^2 \text{ contados}} \times 2 \times 10^4 \quad (\text{III.1})$$

E - Resazurina

A solução de resazurina usada tem uma concentração de 0,049 mg/ml em PBS.

- 1) Diluir a resazurina com DMEM completo numa razão volúmica de 50:50;
- 2) Retirar o meio de cultura dos poços, e substituir pela solução resazurina + DMEM;
- 3) Colocar a cultura a incubar durante 3 horas;

-
- 4) Após o período de incubação, retirar 140 µl da solução de resazurina + DMEM de cada poço da placa de 24, e transferir para um poço da microplaca (placa de 96);
 - 5) Ler a absorvância a 570 nm e 600 nm, com o leitor de microplacas;
 - 6) Lavar duas vezes com PBS cada poço da placa, e no fim, aspirar, adicionar DMEM, e voltar a colocar na incubadora para continuar a avaliar o crescimento celular.

D - Fixar Células

Para a observação por microscopia ótica de fluorescência, as amostras de membranas com células em cultura são previamente fixadas com PFA a 3,7%, em PBS. Depois de fixadas segue-se o protocolo de marcação com o corante de interesse.

- 1) Aspirar o meio de cultura dos poços onde estão as amostras com as células;
- 2) Lavar três vezes com PBS;
- 3) Adicionar 200 µl de PFA, esperar durante 15 minutos, e aspirar;
- 4) Lavar novamente três vezes com PBS;
- 5) Manter as células em PBS, e deixar a 4 °C, até ser substituída pela solução de corante.

F - Marcação DAPI

- 1) Adicionar 50 µl de uma solução de DAPI, a uma concentração de 300 nM em PBS, nas amostras a analisar, e deixar atuar durante 5 minutos;
- 2) Transferir cada amostra para uma lamela de vidro;
- 3) Observar ao microscópio as marcações nucleares, usando uma fonte de luz de mercúrio e o bloco de filtros UV-2E/C.

G - Marcação Calceína-AM

- 1) Adicionar 100 µl de uma solução de calceína-AM, a 0,4% em PBS, nas amostras a analisar, e deixar atuar durante 5 minutos;
- 2) Transferir cada amostra para uma lamela de vidro;
- 3) Observar ao microscópio as marcações do citoplasma, usando uma fonte de luz de mercúrio e o bloco de filtros B-2E/C.

H - Cortes Histológicos

Os cortes histológicos tiveram lugar no CEDOC, com a colaboração da diretora Dr.^a Teresa Barona, e da investigadora Dr.^a Ana Farinho.

- 1) Diluir as amostras em sacarose a 30%, uma solução crioprotetora, e deixar em repouso durante a noite;

- 2) Introduzir as amostras num molde de plástico, adicionar um meio de montagem, o OCT, e colocar no congelador a -80 °C durante 1 hora;
- 3) Remover o bloco de gelo do molde e montar no suporte do criostato a -20 °C;
- 4) Devastar o bloco sensivelmente até à zona central da amostra, e a partir daí realizar os cortes microscópicos;
- 5) Transferir os cortes para as lâminas carregadas positivamente, previamente tratadas com (3-Aminopropyl)triethoxysilane;
- 6) Preservar os cortes a 4 °C até posterior marcação com um corante.

Antes de adicionar o marcador, lavar os cortes com água ultrapura para eliminar o OCT.

MEMBRANA DE PCL+PEO+CS100-0 com 10%CS

Na possibilidade de alargar a rede de poros de uma membrana de PCL+PEO+CS, foi produzida uma matriz com grãos de CS em maior concentração e menor granulometria. Os parâmetros de produção desta matriz para a solução de PCL mativeram-se os mesmos, enquanto que para a solução de PEO+CS foi preparada uma concentração de 10% de grãos de CS com granulometrias de [100-0] μm , e foram usados os seguintes parâmetros:

- Tensão = 16 kV
- Caudal = 2,5 ml/h
- Distância = 33 cm

Estes parâmetros permitem estimar que a matriz produzida tem uma proporção de PCL:CS de 1:3,8. As imagens de seguida ilustram a superfície desta membrana. Apesar de alguma não uniformidade, é possível observar uma estrutura relativamente mais expandida do que as estruturas apresentadas na secção 4.1.1 - Análise Morfológica.

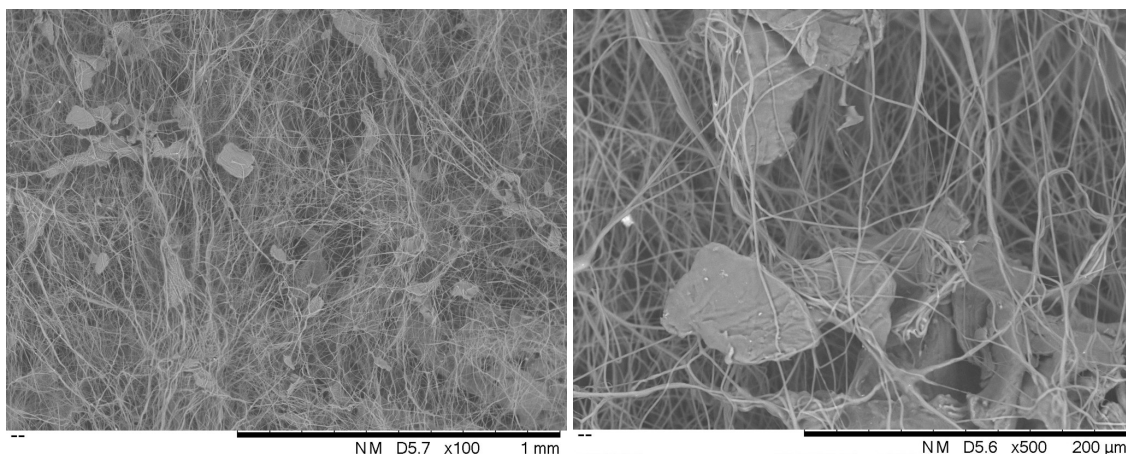


Figura IV.1: Imagens de microscopia eletrónica de varrimento da membrana de PCL+PEO+CS com 10% de CS. Grãos com tamanhos compreendidos entre 100 e 0 μm .